



**Escola Superior d'Agricultura
de Barcelona**

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

Anàlisi de la composició de l'alga *Ulva ohnoi*: efectes de la densitat de cultiu i la il·luminació



Alumna: Maria Assens Blanch

Tutores: Ingrid Masaló

Patricia Jiménez

Resum

L'aqüicultura ha estat un sector en creixement durant els últims anys arribant a augmentar el 7.7% de mitjana anualment en la última dècada. En augmentar la producció també ho fa l'impacte ambiental que inevitablement es dona en aquesta pràctica. Per tal de poder satisfer la demanda i, d'altra banda, disminuir aquest impacte, els cultius IMTA guanyen interès.

En aquest treball s'estudia la composició de la macroalga *Ulva ohnoi*, cultivada en un sistema IMTA-RAS en combinació amb un cultiu de peixos, en diferents condicions de densitat i intensitat lumínica. En aquest sistema les algues aprofiten, per el seu creixement, els nutrients i la matèria orgànica provinent de l'aigua residual dels tancs de peixos. D'aquesta manera, el cultiu d'algues que s'utilitza com a biofiltre també té valor comercial.

Es quantifiquen els paràmetres nutricionals bàsics (matèria mineral, fòsfor, nitrogen orgànic, els nitrats) de la macroalga, en matèria seca, per estudiar l'efecte de les condicions de cultiu, la densitat i la llum, d'aquesta. S'han cultivat les algues a tres densitats diferents (0.8 Kg m^{-2} , 1 Kg m^{-2} , 1.6 Kg m^{-2}) durant tres setmanes amb tres il·luminacions diferents (886 , 280 i $163 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

En general no sembla que la composició de l'alga canvi significativament en variar les condicions de cultiu. El contingut de nitrogen és el que presenta més relació amb els canvis de densitat i il·luminació. Encara que no hi ha acumulació de nitrats s'ha pogut observar que el contingut de nitrogen, orgànic i total, augmenta amb la alta intensitat lumínica i baixa densitat. Això repercuteix en els valors del ratio C/N, el qual difereix significativament entre les mostres cultivades amb il·luminació màxima i mínima.

Resumen

La acuicultura ha sido un sector en crecimiento durante los últimos años llegando a aumentar el 7.7% de media anualmente en la última década. Al aumentar la producción también lo hace el impacto ambiental que inevitablemente se da en esta práctica. Para poder satisfacer la demanda y, por otro lado, disminuir este impacto, los cultivos IMTA ganan interés.

En este trabajo se estudia la composición de la macroalga *Ulva Ohnoi*, cultivada en un sistema IMTA-RAS en combinación con un cultivo de peces, en diferentes condiciones de densidad e intensidad lumínica. En este sistema las algas aprovechan, para su crecimiento, los nutrientes y la materia orgánica proveniente del agua residual de los tanques de peces. De este modo, el cultivo de algas que se utiliza como biofiltro también tiene valor comercial.

Se cuantifican los parámetros nutricionales básicos (materia mineral, fósforo, nitrógeno orgánico, los nitratos) de la macroalga, en materia seca, para estudiar el efecto de las condiciones de cultivo, la densidad y la luz, de la misma. Se han cultivado las algas a tres densidades diferentes (0.8, 1 y 1.6 Kg m⁻²) durante tres semanas con tres intensidades luminicas diferentes (886, 280 y 163 μmol m⁻²s⁻¹).

En general no parece que la composición del alga cambio significativamente al variar las condiciones de cultivo. El contenido de nitrógeno es el que presenta más relación con los cambios de densidad e iluminación. Aunque no hay acumulación de nitratos se ha podido observar que el contenido de nitrógeno, orgánico y total, aumenta con la alta intensidad lumínica y baja densidad. Esto repercute en los valores del ratio C / N, el cual difiere significativamente entre las muestras cultivadas con iluminación máxima y mínima.

Abstract

Aquaculture has been a growing sector in recent years reaching an average 7.7% increase in the last decade. By increasing production, so does the environmental impact that inevitably occurs in this practice. In order to meet the demand and, on the other hand, to reduce this impact, IMTA crops gain interest.

In this work the composition of the macroalgae *Ulva Ohnoi* is studied, cultivated in an IMTA-RAS system in combination with a fish culture, in different conditions of density and luminous intensity. In this system the algae take advantage, for their growth, of the nutrients and the organic matter coming from the residual water from the fish tanks. In this way, the algae culture that is used as a biofilter also has commercial value.

The basic nutritional parameters (mineral matter, phosphorus, organic nitrogen, nitrates) of the macroalgae, in dry matter, are quantified to study the effect of the culture conditions, density and light of the same. The algae have been cultivated at three different densities (0.8, 1 and 1.6 Kg m⁻²) for three weeks with three different illuminations (886, 280 and 163 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

In general, it does not seem that the composition of the algae changes significantly when varying the conditions of cultivation. The nitrogen content is the one that has more relation with the changes of density and illumination. Although there is no accumulation of nitrates it has been observed that nitrogen content, organic and total, increases with high intensity light and low density. This affects the values of the C / N ratio, which differs significantly between the samples cultivated with maximum and minimum lighting.

Agraïments

A la meva família i amics per recolzar-me en tot moment durant tota la carrera. A les meves tutores Ingrid Masaló i Patricia Jiménez per aclarir els meus dubtes i ajudar-me durant tot el treball; a María Rodríguez i Samuel Machado per l'ajuda i el recolzament al laboratori.

Continguts

Resum.....	2
Resumen.....	3
Abstract	4
Agraïments	5
1. Introducció	8
1.1 Aqüicultura multitròfica integrada i aqüicultura multitròfica integrada en un sistema de recirculació	8
1.2 Les macroalgues i la <i>Ulva</i>	9
1.3 Característiques de <i>Ulva</i> en funció de les condicions de cultiu	11
1.3.1 Temperatura.....	11
1.3.2 Llum	11
1.3.3 Densitat de cultiu	11
1.3.4 Salinitat.....	12
1.3.5 Concentració de Nitrogen i Fòsfor a l'aigua	12
2. Objectius.....	13
3. Materials i Metodologia	13
3.1 Descripció de la instal·lació i disseny experimental	13
Disseny experimental	14
3.2 Control de la instal·lació.....	16
3.2.1 Resultats del control de l'aigua: Nitrats i fosfats	16
3.2.2 Resultats del control de les algues: producció, matèria seca i carboni.	17
3.3 Anàlisi.....	20
3.3.1 Determinació de matèria mineral	20
3.3.2 Determinació del fòsfor	20
3.3.3 Determinació de Nitrats	21
3.3.4 Determinació de Nitrogen orgànic.....	21
3.4 Anàlisi estadística	22
4. Resultats i discussió.....	22
4.1 Contingut en matèria mineral	22
4.2 Contingut en fòsfor	25
4.3 Contingut en Nitrogen orgànic.....	28
4.4 Contingut en nitrats	30
4.5 Contingut de Nitrogen total i valors de les relacions N/P i C/N	33

4.5.1 Contingut de Nitrogen total	33
4.5.2 Relació entre els continguts en nitrogen i fòsfor i carboni i nitrogen de l'alga	36
4.6 Valoració global de la composició de les algues en funció de les condicions de cultiu	37
5. Conclusions.....	39
6. Bibliografia	40
Annex	45
1. Procediments	45

1. Introducció

1.1 Aqüicultura multitròfica integrada i aqüicultura multitròfica integrada en un sistema de recirculació

L'aqüicultura ha sigut un sector en creixement en els últims anys, degut a la gran demanda de productes del mar, i a la limitada indústria pesquera. L'aqüicultura de peix i marisc ha crescut de mitjana un 7.7% anual durant l'última dècada (Gjedrem et al., 2012). Encara que aquest sector presenta innegables beneficis, com pot ser la provisió de menjar de bona qualitat i accessible a una població creixent i els llocs de treball generats, d'entre altres, s'ha generat polèmica. L'inconvenient principal d'aquesta activitat és que pot provocar impactes ambientals que s'agreujarien amb el temps, així com conflicte amb altres sectors (turisme, impacte visual, etc.), sobretot en aqüicultura marina.

L'eutrofització o enriquiment de nutrients del medi és un dels impactes que pot causar l'aqüicultura. L'eutrofització pot ser causada per l'alimentació que no ha estat consumida per un cultiu, especialment si se'l sobrealimenta (Focardi et al., 2005; Crab et al., 2007), la descomposició d'organismes morts i també per l'excés d'enriquiment del medi (Burford et al., 2001). S'ha documentat que el nitrogen conservat com a biomassa pels organismes d'un cultiu és només del 20 al 50% del nitrogen subministrat (Jackson et al., 2003; Schneider et al., 2005), el nitrogen restant s'allibera al medi i això pot causar aparició de colònies de fitoplàncton, algunes de les quals poden ser tòxiques per altres organismes, poden causar males olors i l'aparició de patògens (Martínez-Córdova et al., 2007). També és preocupant l'increment d'amoniac en el medi ja que és altament tòxic per a molts organismes aquàtics (Casillas-Hernández et al., 2007).

Per poder minimitzar les conseqüències d'aquest impacte, comença a guanyar interès un tipus de cultiu anomenat IMTA (*Integrated Multitrophic Aquiculture*) o AMTI (Aqüicultura Multitròfica Integrada); és un tipus de cultiu integrat per diferents espècies, pertanyents a diferents nivells tròfics, amb l'objectiu que els metabòlits d'una d'aquestes pugui ser aprofitada per una altra (Troell et al., 2003). Que el cultiu sigui integrat fa referència a que és un cultiu de diferents espècies però aquestes no es troben a la mateixa ubicació (en el mateix tanc), sinó que els cultius estan pròxims i hi ha una transferència de nutrients a través de l'aigua (Soto, 2009). Que el cultiu estigui dissenyat d'aquesta manera pot reduir els impactes ambientals esmentats abans perquè hi haurà espècies que no requeriran subministrament d'aliment ja que el residu d'una espècie es converteix en aliment per a un altre (Chopin et al., 2001). Basant-se en aquest concepte de reciclatge, l'IMTA és una manera diferent de producció que redueix els efectes ambientals i que pot augmentar els beneficis econòmics per als productors i les comunitats (Govern de Canadà, 2013).

Entre les tècniques d'aqüicultura multitròfica integrada, la integració de cultius de peixos i macro algues en sistemes d'aqüicultura amb recirculació (IMTA-RAS) és, actualment, una de les més prometedores línies d'acció. En els sistemes RAS, l'aigua dels tancs de peixos passa per biofiltres, on té lloc la nitrificació (pas de nitrogen amoniacal a nitrat); la renovació d'aigua en aquests sistemes ve determinada per l'augment de nitrat a l'aigua (tòxic pels peixos a nivells de 100ppm, més alt que el nivell tòxic de N-NH_3 de 50ppm i N-NH_4 que és molt menys tòxic). Les algues tenen una alta capacitat per utilitzar el nitrat com a font de nitrogen, per tant en un

sistema IMTA-RAS, on les algues utilitzin el nitrat com a font de nitrogen, la renovació d'aigua serà menor que en un sistema RAS. Amb aquesta integració es redueix la renovació d'aigua i l'impacte ambiental ja que les algues absorbeixen part del fòsfor i nitrogen excretat pels peixos i, també aprofiten el CO₂ que alliberen aquests quan respiren. Com a producte de la fotosíntesis, les algues alliberen oxigen que pot ser aprofitat pels peixos. Per tant, a més de la reducció de l'impacte ambiental i de la utilització d'aigua, les algues poden esdevenir una font de proteïnes i components bioactius per al consum humà i animal o aplicacions farmacèutiques (Masaló et al., 2016), essent un valor afegit a l'activitat aquícola. Un aspecte important que també cal tenir en compte és que amb un ús limitat d'aigua a la instal·lació es redueix l'impacte de patògens en el cultiu ja que les malalties invasives de l'ambient exterior es minimitzen. En els sistemes on hi ha recirculació l'ús de les medicines es redueix de manera significativa i això repercuteix en la producció i el medi ambient.

1.2 Les macroalgues i la *Ulva*

El terme macroalga s'utilitza per distingir les algues més grans de les microalgues, que tenen una mida microscòpica i són, en molts casos, unicel·lulars. Les microalgues formen part del fitoplàncton i viuen en suspensió, mentre que les macroalgues poden viure fixades a un substrat. Amb poques excepcions, les macroalgues creixen unides a superfícies dures, com el corall mort o la roca. La majoria de les espècies no poden créixer en fang i sorra, ja que, manca l'ancorament al sediment. En comparació amb plantes superiors (vasculars), les macroalgues tenen cicles de vida bastant complexos i una gran varietat de modes de reproducció. La majoria de les algues es reproduïxen alliberant gàmetes o espores produïdes sexualment o asexualment i propagació vegetativa i/o fragmentació (trencament de peces vegetals per produir nous individus) (Littler i Littler, 2013).

Les algues es poden classificar en tres grans grups, basant-se en la seva pigmentació: brunes, vermelles i verdes, que reben els noms botànics de feofícies, rodofícies y clorofícies, respectivament (Helm i Bourne 2004). Les algues brunes acostumen a ser grans, arribant a mesurar 20 metres de llarg. El gruix pot variar entre els 30 i els 60 centímetres, en les més menudes, i fins a 2 i 4 metres, en les més grosses. Les algues vermelles són de mida més petita, i poden arribar a tenir un metre de longitud. Les verdes tenen una mida semblant a les vermelles. Poden tenir una morfologia molt diferent les unes de les altres. Prenen una àmplia gamma de formes, que van des de costelles simples, folioses (frondosos) i formes filamentosos (filiformes) amb estructures de branca simples, fins a formes més complexes amb estructures altament especialitzades per a la captura de llum, la reproducció, el suport, la flotació i l'acoblament a el fons marí. La grandària de les macro algues oscil·la entre uns quants mil·límetres i plantes fins a 3-4 m de llargada (per exemple, *Sargassum*) (Littler i Littler, 2013).

Avui en dia, les algues tenen moltes finalitats com comercialitzar-se com producte alimentari, per l'extracció d'hidrocol·loïdes, per l'ús com additiu o fertilitzant, en cosmètics, com font indirecta de combustibles i per al tractament d'aigües residuals entre d'altres. L'alga com a producte alimentari es consumeix des del segle IV al Japó i des del segle VI a la Xina i, juntament amb la República de Corea són els majors consumidors actualment. Degut a la emigració d'habitants d'aquests països a l'occident i a la globalització, s'ha creat una demanda

en molts altres països que, en els últims cinquanta anys ha superat l'oferta de reserves naturals silvestres. Per aquesta necessitat s'ha desenvolupat una indústria que ha arribat a produir fins el 90% de la demanda del mercat. L'agar, l'aginat i la carragenina són els tres hidrocol·loïdes que s'extreuen d'algues vermelles i brunes i tenen la finalitat d'espessir solucions aquoses, formar gelatines i estabilitzar alguns productes com el gelat. Els hidrocol·loïdes també s'utilitzen en la indústria de la cosmètica degut a les seves propietats humectants. Una altra finalitat de les algues és fer-ne farina i fer-la servir com additiu en els pinsos o aplicar-les al terra com a fertilitzant. En els últims anys també s'han estudiat com a font de combustible indirecte, ja que es poden fermentar per produir gas metà i, posteriorment combustible. A més a més s'han estudiat per al tractament d'aigües residuals absorbint nutrients i, en alguns casos, metalls pesants (McHugh2003).

Ulva és un gènere d'alga verda coneguda comunament com l'enciam de mar. Aquesta es troba arreu del món en hàbitats marins rics en nitrogen, junt a les roques (Lee, 2008; Kirby, 2001). Les fulles d'*Ulva* solen créixer en forma laminar, però existeixen algunes espècies de forma tubular. Aquestes espècies tubulars van ser classificades anteriorment com un gènere diferent, Enteromorfa, però ara s'inclouen a *Ulva* (Hayden et al., 2003; Lee, 2008). Les fulles poden créixer fins a 40 cm de longitud, però són molt primes ja que estan formades per només dues capes de cèl·lules (Lee, 2008). Prolifereixen en ambients il·luminats i en excés de nutrients, per el qual abunden en zones portuàries, llocs protegits i estuaris, intervenint en la formació de les denominades "marees verdes" (APROMAR, 2014). En aquest gènere es troba l'espècie *Ulva Ohnoi*, la morfologia de la qual es pot descriure com: làmina de color verd brillant amb lluentor metàl·lica i de forma orbicular, obovada o ovada, en ocasions irregular, amb un gruix de 30-50 micres a la zona apical-mitjana i 80-90 micres a la zona basal, presència de dents microscòpics en el marge, cèl·lules amb forma quadrangular o poligonal en visió superficial i rectangulars a quadrades en visió transversal (Hiraoka et al., 2003).

Aquestes algues en particular tenen interès degut a la seva eficàcia en sistemes de cultiu IMTA, ja que tenen la capacitat de captar amoni i nitrat, i la seva morfologia facilita el seu cultiu en tancs. A més a més tenen una taxa de creixement alta i un rang de tolerància ampli en quant a radiació i temperatura. Per altra banda, també destaca per el seu valor a la indústria alimentària, essent un aliment bàsic en algunes regions del món. El consum d'algues *Ulva* sp s'ha vist incrementat en els últims anys degut al seu contingut del 15% o més de proteïnes, 50% de sucre i midó, menys d'1% de greix, alt contingut en ferro, iode, alumini, manganès i níquel. També és ric vitamines A, B1 i C, sodi, potassi, magnesi, calci, nitrogen soluble, fòsfor, clorur, silici, rubidi, estronci, bari, radi, cobalt, bor i oligoelements (Kirby, 2001). En un estudi realitzat a la Coruña (Casais,2016), on es compara el contingut nutricional de les espècies *Ulva australis*, *Ulva fasciata*, *Ulva rigida* i *Ulva ohnoi*, va determinar que les espècies *Ulva rigida* i *Ulva ohnoi* són les espècies que presenten un millor equilibri nutricional. Això és degut a que es va trobar una composició de macro-minerals i oligoelements variada.

1.3 Característiques de *Ulva* en funció de les condicions de cultiu

1.3.1 Temperatura

La temperatura representa un factor ecològic crític que influeix en el creixement i la morfologia de les macroalgues (Garbary, 1979; Van den Hoek, 1984; Pakker et al., 1996; Lee, 2008). La majoria d'algues poden créixer i reproduir-se en un ampli rang de temperatures mitjançant la modificació de la seva taxa metabòlica (Rinde i Sjøtun, 2005). Les algues han desenvolupat mecanismes d'adaptació bioquímiques i fisiològiques, com ara la modificació de les propietats de les seves membranes cel·lulars, els ajustos enzimàtics i la concentració de les seves proteïnes, que els permeten maximitzar el seu rendiment en referència a les temperatures que experimenten (Eggert, 2012).

Una alta temperatura pot causar la mort d'algues, així com la desnaturalització de les proteïnes i el dany a les membranes, mentre que a una temperatura molt baixa, els lípids i les proteïnes de les membranes cel·lulars poden ser malmeses a causa de la formació de cristalls de gel intracel·lulars (Lüning, 1990). Diversos estudis han demostrat la influència de la temperatura en l'absorció de diferents nutrients (Gerard, 1997; Ozaki et al., 2001). Segons un estudi, realitzat en el cultiu de *Ulva curvata* i *Ulva rígida*, la temperatura que promou el creixement d'algues més ràpid pot variar entre 10 i 20 ° C (Taylor et al., 2001).

1.3.2 Llum

La llum juga un paper essencial per als organismes fotosintètics en l'assimilació del carboni durant el procés de fotosíntesi. La seva qualitat també pot tenir un impacte en el creixement, la pigmentació i el mecanisme fotosintètic (Lüning i Dring, 1985; Figueroa et al., 1995; Aguilera et al., 2002).

Tot i que la llum representa la font primària d'energia per a la reacció de fotosíntesi, l'exposició perllongada d'algues a altes intensitats podria afectar al sistema fotosintètic (Sampath-Wiley et al., 2008). També pot causar danys a l'ADN (Pakker et al., 2000), disminució del creixement (Aguilera et al., 2002), inhibició de la fotosíntesi (Bischof et al., 1998) i pot interferir en les activitats enzimàtiques (Bischof et al., 2000; Figueroa i Viñegla, 2001). Segons el mateix estudi que en el cas anterior, les taxes de creixement més ràpides registren en rangs d'irradiació des de 18000 fins a 175000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Taylor et al., 2001).

En el cas d'*Ulva curvata* s'ha trobat que el creixement se satura a irradiancies pròximes a 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tot i que la fotoinhibició (efecte sobre el sistema fotosintètic) es dona per sobre dels 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Coutinho i Zingmark, 1993; Rorrer i Cheney, 2004).

1.3.3 Densitat de cultiu

Un factor important en el cultiu d'algues és la densitat de cultiu. Una densitat massa alta comporta l'existència de competició pels recursos, com la llum i els nutrients. Per altra banda, una densitat de cultiu excessivament baixa pot causar una exposició massa perllongada a la llum, que podria afectar a la fotosíntesi.

En un estudi dut a terme amb *Ulva lactuca* es va determinar que una densitat apropiada per al cultiu es d' 1 Kg m^{-2} (Msuya i Neori, 2008; Msuya, 2009). En un altre estudi es va concloure que

un cultiu amb una densitat d' *Ulva Lactuca* de 3 Kg m^{-2} mostra una taxa de creixement més ràpida que un cultiu amb una densitat més alta (Al-Hafedh et al., 2015); no obstant al parlar de densitats sempre cal tenir en compte el flux de fotons fotosintètics (PFD: $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a que estan sotmeses les algues.

1.3.4 Salinitat

Juntament amb la llum i la temperatura, la salinitat es considera un dels principals factors abiòtics que afecten el creixement i la distribució d'algues en nombrosos hàbitats (Kirst i Wiencke, 1995). Una salinitat més alta o més baixa que l'òptim podrien afectar la regulació osmòtica en algues (Eggert ,2012; Beauchamp, 2012). A més, també es pot alterar el potencial d'aigua externa i la pressió de turgència, i pot interferir en la distribució dels ions i els soluts orgànics dins de la cèl·lula (Kumari et al., 2010).

S'ha trobat que una salinitat no adequada al medi pot afectar negativament al creixement i l'absorció de nutrients d'algunes espècies d'*Ulva* (Fong et al., 1996).

Sota aquests tipus d'estrès, les algues podrien reduir el creixement i augmentar els enzims antioxidants i les concentracions de pigments (Kumari, et al., 2010).

En un estudi es van registrar les majors taxes de creixement per a algues cultivades en el rang de 6.8 a 27.2 parts per mil. Diverses espècies (*Ulva curvata* i *Ulva rígida*) foren tolerants a salinitats tan baixes com 3.4 i 0 parts per mil (Taylor et al.2001).

1.3.5 Concentració de Nitrogen i Fòsfor a l'aigua

Els nutrients són un dels factors més importants que regulen el creixement, reproducció, desenvolupament, morfologia, components bioquímics i emplaçament d'algues (DeBoer, 1981). El nitrogen i el fòsfor són dos dels macronutrients més estudiats que afecten les macroalgues (DeBoer, 1981; Lapointe, 1987; Valiela et al., 1997).

En concret, les espècies d'*Ulva* poden absorbir i metabolitzar ràpidament el fòsfor i el nitrogen inorgànics, i per això són dos nutrients primaris que es tenen en compte en l'aqüicultura intensiva (Lawton et al.,2013).Les principals fonts de nitrogen utilitzades en el medi ambient, són l'amoni (NH_4^+) i el nitrat (NO_3^-) (Copertino et al., 2009). El fòsfor s'incorpora en forma de fosfat.

En comparació amb altres algues, les pertanyents a l'espècie d'*Ulva* van mostrar una baixa capacitat d'emmagatzematge de nutrients (Pedersen i Borum, 1997). Aquestes, tenen una elevada relació de superfície i volum (ràtio SA: V) i, degut a això requereixen una absorció més elevada de nutrients. Conseqüentment, són més abundants en medis en els quals, els nivells de nutrients són alts (Wallentinus, 1984; Karez et al., 2004).

S'ha trobat una àmplia tolerància a una àmplia gamma de concentracions N i P. Les taxes de creixement màximes s'han registrat en concentracions de nutrients que van des de 10 a 100 $\text{mmol m}^{-3} \text{ PO}_4$, 100 a 1000 $\text{mmol m}^{-3} \text{ NO}_3$ i 60 a 100 $\text{mmol m}^{-3} \text{ NH}_4$ (Taylor et al., 2001). Aquests valors són equivalents a 0.95 a 9.5 $\text{mg L}^{-1} \text{ PO}_4$, 6.2 a 62 $\text{mg L}^{-1} \text{ NO}_3$ i 1.08 a 1.8 $\text{mg L}^{-1} \text{ NH}_4^+$.

2. Objectius

Aquest TFG s'enmarca en el projecte de recerca "Influència de les condicions ambientals a la composició de l'*Ulva Ohnoi* cultivada a un sistema IMTA-RAS" que estudia un sistema d'aqüicultura multitròfica integrada amb recirculació d'aigua en el qual es cultiven llenguados i algues (enciam de mar).

L'objectiu general d'aquest treball és estudiar la influència de les condicions de cultiu, densitat i intensitat lumínica, sobre la composició de l'alga *Ulva Ohnoi* en un sistema IMTA –RAS. Concretament es plantegen els següents objectius específics:

- Quantificar els paràmetres nutricionals bàsics (matèria mineral, fòsfor, nitrogen orgànic i nitrats) en mostres d'alga assecada que han estat cultivades en diferents condicions de densitat i il·luminació.
- Estudiar la influència de les combinacions de tres densitats de cultiu i tres il·luminacions sobre la composició de l'alga a l'inici i al final del període de cultiu.

3. Materials i Metodologia

En aquest apartat es descriu la part experimental del projecte on s'emmarca aquest treball encara que el TFG es centra en la part d'anàlisi de les mostres d'alga ja assecades (apartat 3.3).

3.1 Descripció de la instal·lació i disseny experimental

Tant la instal·lació on s'han dut a terme els diferents cultius de l'alga com el laboratori on s'han analitzat les mostres, es troben a l'ESAB (Escola Superior d'Agricultura de Barcelona).

El laboratori on es porta a terme el cultiu de peixos i algues, com es pot veure a la figura 3.3-1 consta de 2 tancs de peixos, 3 tancs d'algues, 3 focus, 1 tanc d'expansió i un dipòsit intermedi, on hi ha el filtre biològic

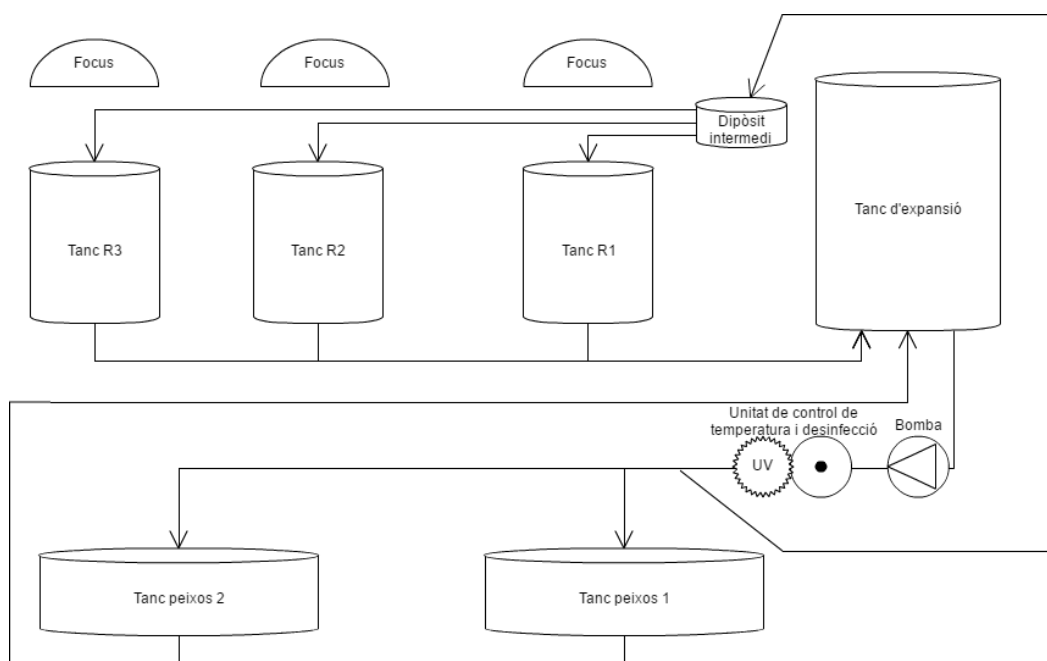


Figura 3.1-1 Esquema de la instal·lació. Font: Klimaitis, 2016.

Els tancs destinats al cultiu de peixos són cilíndrics amb un diàmetre interior de 98.5 cm i una alçada d'aigua de 28 cm. Aquests tancs, en els quals es cultiven 25 Kg de llenguados (*Solea senegalensis*), disposen d'un subministrament d'aire i el cabal d'entrada d'aigua és d'uns 400 L h⁻¹.

Els tancs on es cultiva l'alga *Ulva ohnoi* (tancs R) són cilíndrics amb una superfície circular de 0.322 m² i un volum de 90 L. L'aeració s'efectua per la part inferior, lleugerament còncava, i assegura el moviment constant de les algues per tal de rebre la llum proporcionada pels focus. Cada tanc té un focus que proporciona una intensitat lumínica. L'aigua provinent de la sortida del biofiltres es proporciona als tancs mitjançant bombes peristàltiques, per regular-ne el cabal. La sortida de l'aigua té lloc a través de mig tub amb petits forats a la paret interior per tal de permetre el pas de l'aigua i retenir les algues dins del tanc. Posteriorment l'aigua de sortida puja fins a un colze, que es troba a una alçada similar al nivell de l'aigua del tanc, quan el nivell del tanc puja fa que l'aigua del colze es desplaci fins al tanc d'expansió.

El tanc d'expansió és cilíndric, amb un diàmetre interior de 80 cm i d'alçada 60 cm, que conté un filtre biològic que oxida l'amoni, NH₄⁺, excretat pels peixos, transformant-lo en nitrat, NO₃⁻.

El dipòsit intermedi rep l'aigua del tanc d'expansió i la reparteix als tancs R. Aquest, té una boia que taponi l'entrada d'aigua si el nivell del dipòsit excedeix un cert nivell.

Aquest sistema també compta amb una desinfecció de llum ultraviolada per patògens, un control de temperatura a aproximadament 20°C i les bombes peristàltiques que permeten injectar cabals inferiors a 8 L h⁻¹ als tancs R (tancs d'algues).

Disseny experimental

En la instal·lació descrita anteriorment, es van dur a terme tres experiments consecutius, cadascun dels quals van tenir una durada de tres setmanes. Els tres experiments s'han dissenyat de manera que hi hagués tres bioreactors (R1, R2 i R3), amb la mateixa densitat d'alga *Ulva Ohnoi*, il·luminats amb intensitats diferents: 886, 280 i 163 μmol m⁻² s⁻¹. En l'experiment 1 la densitat escollida correspon a 2.4 Kg m⁻², i en l'experiment número 2 i 3 les densitats són 1.6 i 0.8 Kg m⁻² respectivament, com es mostra a la taula 3.3-1.

Taula 3.1-1: Condicions del cultiu, llum i densitat de biomassa , d'*Ulva ohnoi* en els tres experiments realitzats.

	Experiment 1		
Tanc	R1	R2	R3
Llum ($\mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$)	886	280	163
Densitat (Kg m^{-2})	2,4	2,4	2,4
	Experiment 2		
Tanc	R1	R2	R3
Llum ($\mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$)	886	280	163
Densitat (Kg m^{-2})	1,6	1,6	1,6
	Experiment 3		
Tanc	R1	R2	R3
Llum ($\mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$)	886	280	163
Densitat (Kg m^{-2})	0,8	0,8	0,8

A la taula 3.1-2 es mostra el calendari dels experiments que van tenir lloc entre el març i el juny de l'any 2016. De l'experiment 1 es van recollir les mostres del 5 i del 21 d'abril, de l'experiment 2 les mostres del 25 d'abril i del 12 de maig i, per últim, de l'experiment 3 es van recollir les mostres del 19 de maig, del 2 i el 6 de Juny. En l'experiment 3 s'ha considerat l'anàlisi de la mostra recollida el dia 2 de Juny del 2016 per el tanc R1 mentre que per analitzar les mostres dels tancs R2 i R3 s'ha escollit la mostra del dia 6 de Juny del 2016. Això és degut a la manca de mostra suficient per realitzar les repeticions dels anàlisis.

Taula 3.1-2: Calendari dels tres experiments consecutius en els quals, l'alga *Ulva Ohnoi* es cultiva en diferents condicions

	Dilluns	Dimarts	Dimecres	Dijous	Divendres	Dissabte	Diumenge
Experiment 1				31/03/2016	01/04/2016	02/04/2016	03/04/2016
	04/04/2016	05/04/2016	06/04/2016	07/04/2016	08/04/2016	09/04/2016	10/04/2016
	11/04/2016	12/04/2016	13/04/2016	14/04/2016	15/04/2016	16/04/2016	17/04/2016
	18/04/2016	19/04/2016	20/04/2016	21/04/2016	22/04/2016	23/04/2016	24/04/2016
Experiment 2	25/04/2016	26/04/2016	27/04/2016	28/04/2016	29/04/2016	30/04/2016	01/05/2016
	02/05/2016	03/05/2016	04/05/2016	05/05/2016	06/05/2016	07/05/2016	08/05/2016
	09/05/2016	10/05/2016	11/05/2016	12/05/2016	13/05/2016	14/05/2016	15/05/2016
Experiment 3	16/05/2016	17/05/2016	18/05/2016	19/05/2016	20/05/2016	21/05/2016	22/05/2016
	23/05/2016	24/05/2016	25/05/2016	26/05/2016	27/05/2016	28/05/2016	29/05/2016
	30/05/2016	31/05/2016	01/06/2016	02/06/2016	03/06/2016	04/06/2016	05/06/2016
	06/06/2016	07/06/2016	08/06/2016	09/06/2016	10/06/2016		

En la taula 3.1-2 s'ha ressaltat en blau les dates corresponents a la recollida de les mostres utilitzades per ser analitzades posteriorment. Les cel·les s'han marcat en tres tonalitats de blau, de clar a fosc, que corresponen a les mostres d'inici i final dels experiments 1.2 i 3 respectivament.

3.2 Control de la instal·lació

Es feien controls de nitrats i fosfats de l'aigua dels tancs dos cops per setmana així com la presa de mostra de les algues, per tal de veure com evolucionaven.

La presa de mostres es duia a terme dos cops per setmana de manera que s'extreien les algues dels tres tancs per separat i es centrifugaven per, posteriorment, pesar-les. La centrifugació de la biomassa és important per tal de determinar-ne acuradament el pes fresc. Seguidament es retornava part de la biomassa fresca als tancs per mantenir una densitat inicial constant durant totes les setmanes. Les algues restants es pesaven en tres recipients tarats, diferenciant-ne el tanc d'origen, es rentaven i es destinaven a fer les anàlisis.

El rentat de les algues es feia per retirar l'excés de sal de la superfície d'aquestes i així disminuir possibles interferències en la determinació de matèria mineral i matèria seca. El rentat es feia amb aigua destil·lada i després de la pesada per tal d'evitar que l'alga absorbís aigua degut a la diferència de concentració osmòtica, fet que faria variar el percentatge de matèria seca. Posteriorment, es centrifugava un altre vegada la biomassa per reduir el contingut d'aigua procedent del rentat i així afavorir l'assecat. Un cop rentades, es posaven en safates i es deixaven assecar a l'estufa a 60 °C durant un mínim de 24 hores, per arribar a pes constant. Després s'extreien les safates de l'estufa per deixar-les al dessecador fins arribar a temperatura ambient. Es pesava per calcular la matèria seca de la biomassa de cada tanc i es triturava obtenint un polsim homogeni que, finalment, es guardava en pots indicant el tanc i la data.

3.2.1 Resultats del control de l'aigua: Nitrats i fosfats

A continuació s'exposen aquests resultats ja que poden ser útils per a la interpretació dels resultats.

A les figures 3.4-1 i 3.4-2 i a la taula 3.4-1 es pot veure la concentració de fòsfor i nitrogen així com la relació de nitrogen i fòsfor de l'aigua del cultiu de les mostres.

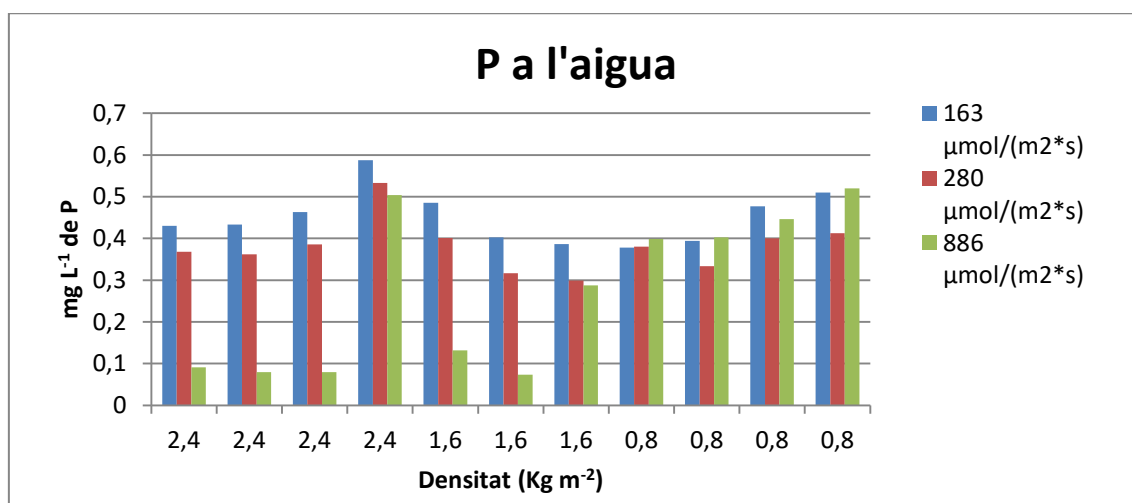


Figura 3.2.1-1: Resultats del contingut en fosfats de l'aigua dels cultius d'alga *Ulva Ohnoi* en diferents condicions de cultiu.

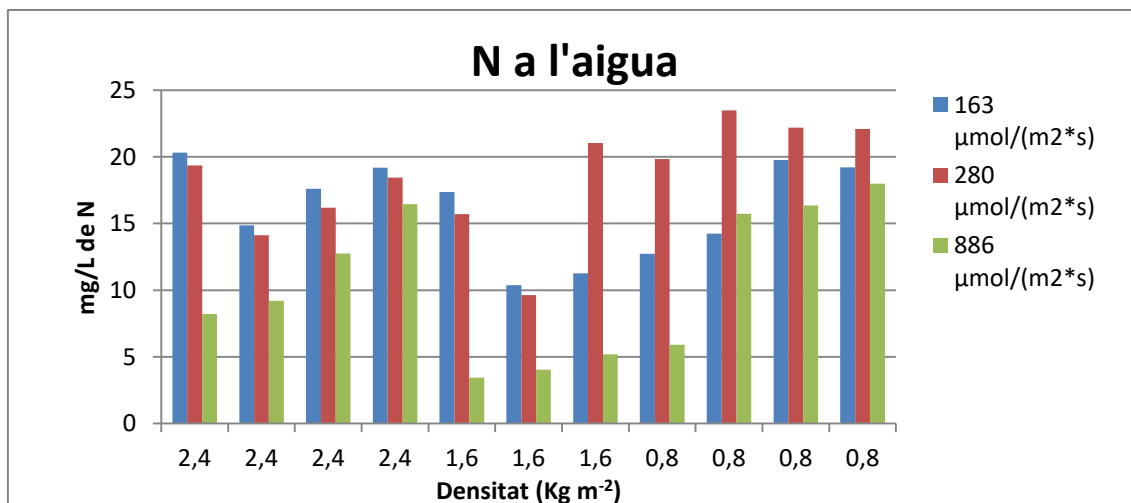


Figura 3.2.1-2: Resultats del contingut en nitrats de l'aigua dels cultius d'alga *Ulva Ohnoi* en diferents condicions de cultius.

Taula 3.2.1-1: Relació entre els continguts de nitrogen i fòsfor de l'aigua dels cultius d'alga *Ulva Ohnoi* en diferents condicions de cultius per les dates de mostreig.

	N:P (p/p)	163 μmol m ⁻² s ⁻¹	280 μmol m ⁻² s ⁻¹	886 μmol m ⁻² s ⁻¹
Experiment 1	Densitat 2,4 Kg m ⁻²			
	08/04/2016	34,59	39,24	115,09
	22/04/2016	32,50	34,78	32,91
Experiment 2	Densitat 1,6 Kg m ⁻²			
	29/04/2016	35,45	39,27	26,47
	11/05/2016	28,90	70,07	17,88
Experiment 3	Densitat 0,8 Kg m ⁻²			
	20/05/2016	33,51	52,17	14,78
	03/06/2016			36,34
	10/06/2016	37,67	53,86	

3.2.2 Resultats del control de les algues: producció, matèria seca i carboni.

En la figura 3.2.2-1 es mostra els resultats de creixement, de l'*Ulva ohnoi* dels tres experiments. Els valors d'aquesta gràfica s'han obtingut a partir de les mitjanes de 6 valors experimentals.

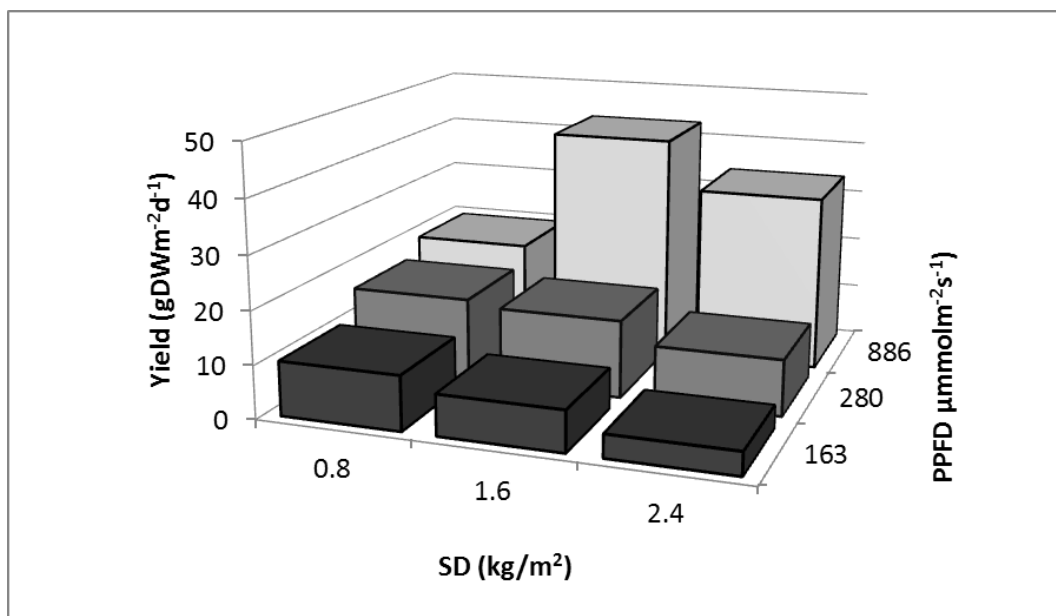


Figura 3.2.2-1: Gràfica de creixement de l'alga *Ulva ohnoi* corresponents als tres experiments. Font: Oca *et al*, 2016. Yield, creixement (g de ms per g i dia) SD, densitat de cultiu (kg per m²) i PPFD, il·luminació $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

En les taules 3.2.2-1, 3.2.2-2 i 3.2.2-3 es poden veure el contingut de matèria seca del conjunt de mostres realitzats. En cada taula es ressalta en blau el resultat de matèria seca de les mostres analitzades en aquest treball que corresponen a la primera (S1) i tercera (S3) setmanes del cultiu. Així mateix s'inclou (taula 3.2.2-4) també els resultats de l'anàlisi del contingut en carboni de les mostres d'algues, que es va encarregar a un laboratori extern.

Taula 3.2.2- 1: Resultats de matèria seca de les mostres d'alga *Ulva Ohnoi* dels cultius amb densitat 2,4 Kg m⁻² (experiment 1) a diferents intensitats lumíniques.

	% Matèria Seca	163 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	280 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	886 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
	31/03/2016	12,07	12,37	10,43
Mostra de S1	05/04/2016	11,42	12,37	10,64
	07/04/2016	12,00	11,50	11,36
	11/04/2016	12,07	12,38	10,99
	14/04/2016	15,73	12,17	10,43
	18/04/2016	14,07	13,22	10,24
Mostra de S3	21/04/2016	13,64	14,05	11,20

S: setmana de cultiu

Taula 3.2.2- 2: Resultats en percentatge de matèria seca de les mostres d'alga *Ulva Ohnoi* dels cultius amb densitat 1,6 Kg m⁻² (experiment 2) a diferents intensitats lumíniques.

	% Matèria Seca	163 μmol m ⁻² s ⁻¹	280 μmol m ⁻² s ⁻¹	886 μmol m ⁻² s ⁻¹
	21/04/2016	13,64	14,05	11,20
Mostra de S1	25/04/2016	13,86	11,84	12,35
	28/04/2016	14,50	13,98	11,85
	02/05/2016	13,91	13,38	11,64
	05/05/2016	14,93	13,45	12,16
	09/05/2016	15,09	12,47	11,20
Mostra de S3	12/05/2016	15,95	14,52	11,35

S: setmana de cultiu

Taula 3.2.2- 3: Resultats en percentatge de matèria seca de les mostres d'alga *Ulva Ohnoi* dels cultius amb densitat 0,8 Kg m⁻² (experiment 3) a diferents intensitats lumíniques.

	% Matèria Seca	163 μmol m ⁻² s ⁻¹	280 μmol m ⁻² s ⁻¹	886 μmol m ⁻² s ⁻¹
	12/05/2016	15,95	14,52	11,35
	15/05/2016	15,15	13,68	13,25
Mostra de S1	19/05/2016	14,35	12,83	15,16
	23/05/2016	14,37	11,58	12,84
	26/05/2016	14,56	11,89	10,72
	30/05/2016	14,90	12,35	10,33
Mostra de S3	02/06/2016	14,70	13,43	9,69
	06/06/2016	13,99	12,38	9,91

S: setmana de cultiu

Taula 3.2.2- 4: Resultats del contingut en carboni de les mostres d'alga *Ulva Ohnoi* per les mostres inicial i final dels tres experiments

% C sms	163 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	280 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	886 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Densitat 2,4 Kg m^{-2}			
05/04/2016	25,43	26,33	29,54
21/04/2016	27,80	29,03	28,99
Densitat 1,6 Kg m^{-2}			
25/04/2016	27,73	28,71	28,14
12/05/2016	29,52	29,33	28,03
Densitat 0,8 Kg m^{-2}			
19/05/2016	29,05	28,83	30,97
02/06/2016			28,37
06/06/2016	30,16	30,17	

3.3 Anàlisis

Per a la realització d'aquest treball s'han dut a terme diferents anàlisis a partir de la biomassa seca de l'alga. Aquestes són: determinació de contingut de matèria mineral, fòsfor, nitrats, i nitrogen orgànic. El contingut en N total s'ha calculat sumant el N orgànic i el N nítric. També s'han estudiat les relacions N/P i C/N. Exposem aquí la metodologia emprada i els procediments detallats es poden trobar a l'annex. A partir de cada mostra es van fer les determinacions per triplicat.

3.3.1 Determinació de matèria mineral

La determinació del contingut en matèria mineral es fa mitjançant el procés de calcinació (gravimetria indirecta). La mostra es posa en gresols, prèviament tractats tèrmicament i pesats, i es pre calcina. Seguidament es calcina, que consisteix en una combustió progressiva de l'aire de la matèria orgànica. Això es fa en un forn mufla a 550°C durant un període de 14 hores. La matèria mineral és el que resta després de fer la calcinació. Per tant, es pot calcular pesant el gresol, amb la matèria mineral després de la calcinació, i restant-li el pes inicial del gresol, sense mostra.

3.3.2 Determinació del fòsfor

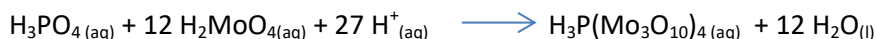
La quantificació del fòsfor, es dur a terme a partir de solucions de cendres de la mostra i mitjançant la colorimetria de Bray- Kurtz.

Obtenció de la solució de cendres

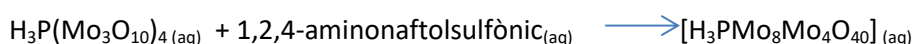
El contingut en cendres representa el total dels components inorgànics continguts en la mostra, en aquest cas només es s'analitza la quantitat de fòsfor. La solució de cendres es dur a terme mitjançant la dissolució d'aquestes, procedents de la calcinació en àcid nítric diluït sobre un bany de sorra per escalfar la mescla i afavorir el procés. Després es filtra i s'enrasa amb aigua destil·lada.

Colorimetria de Bray- Kurtz

Per tal de poder fer la lectura de colorimetria, cal fer la reacció de color afegint dos reactius a la solució de cendres. El primer, reactiu A, és un compost de molibdè que reacciona amb els grups PO_4^{3-} substituint els àtoms d'oxigen, en medi àcid, formant àcid 12-molibdofosfòric. Això es pot veure en la reacció següent:



El segon reactiu que cal afegir, reactiu B, és un reactiu reductor. Aquest reacciona amb l'àcid 12-molibdofosfòric obtenint com a producte el blau de molibdè. El qual s'utilitza per a la lectura mitjançant colorimetria, presentant un color blau i un màxim d'absorció de 660 nm. La reacció descrita és la següent:



3.3.3 Determinació de Nitrats

Per a realitzar l'anàlisi de nitrogen en forma nítrica s'utilitza un elèctrode selectiu de nitrats i un de referència. Els models tant del elèctrode selectiu com del elèctrode de referència són 9662S7 CRISON i 5044 CRISON respectivament.

Aquest anàlisi es pot dividir en tres etapes:

Extracció: Les mostres es preparen afegint un extractant. La solució extractant és una solució aquosa de pH 3 que conté: àcid sulfàmic i sulfat d'alumini per tal d'eliminar interferències de nitrats i matèria orgànica respectivament, a més a més d'àcid bòric com a conservador.

Calibració: Abans de la lectura, es fa una recta patró amb solucions de nitrat potàssic que permetrà traduir les dades de la lectura en mV a concentració expressada en mg N L^{-1} . Per fer aquesta recta, es preparen patrons de 14, 28,70 i 140 ppm de N-nítric, i es representa els mV a l'eix d'ordenades i el logaritme de la concentració de nitrogen nítric a l'eix d'abscisses.

Lectura: L'elèctrode fet servir és de membrana polimèrica i té una escala lineal de treball de 3ppm a $6,2 \text{ gL}^{-1}$ de N-nítric amb un pendent de $55 \pm 4 \text{ mV}$ a una temperatura de $20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$. Aquest, està connectat a un potenciòmetre amb un elèctrode de referència de Ag/AgCl.

3.3.4 Determinació de Nitrogen orgànic

Aquesta es fa mitjançant el mètode Kjeldhal. Es divideix en tres etapes:

Digestió: En aquesta etapa es fa descompondre la matèria orgànica, de la mostra, amb calor i la presència d'àcid sulfúric concentrat. Per aquest procés cal un catalitzador i l'aportació de calor. Aquesta reacció és necessària per la mineralització del nitrogen orgànic, que es transforma en nitrogen amoniacal.

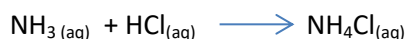


Destil·lació: Després de la digestió, s'alcalinitza la solució amb NaOH i es destil·la el NH₃ després. Aquest NH₃ es recull en un àcid, en aquest cas HCl. En aquest procés succeeixen les reaccions següents:

Primera reacció d'aquesta etapa. Reacció de desplaçament (RD):



Segona reacció d'aquesta etapa. Reacció de fixació de l'amoniac (RF):



Valoració: Finalment es fa una valoració per retrocés del HCl, de la solució, que no ha reaccionat amb el NH₃ que ha destil·lat. Per a la valoració caldrà un indicador de roig de metil.

La reacció següent pertany al procés de valoració (RV):



3.4 Anàlisi estadística

Els resultats estadístics s'han obtingut tractant les dades obtingudes, prèviament analitzades al laboratori, amb el programa Minitab17. Amb aquest programa s'ha obtingut l'anàlisi ANOVA sobre la hipòtesi de que el contingut de nutrient a l'alga no es veu afectat per la llum que rep o la densitat de població en la que es troba. Quan la hipòtesis es rebutja es fa la separació de mitjanes de Tukey a un nivell de significació de $p < 0.05$. També s'ha analitzat si hi ha interacció entre aquests dos factors, mitjançant l'anàlisi ANOVA.

En el planteig de l'ANOVA s'han considerat com a rèpliques els valors de les setmanes S1 i S3. En els casos dels continguts de fòsfor i nitrats no s'ha considerat convenient fer aquesta anàlisi estadística ja que la fluctuació entre les S1 i S3 s'ha considerat important.

4. Resultats i discussió

Els resultats obtinguts en l'anàlisi de les mostres d'algues provinents dels diferents experiments es presenten separatament per cada paràmetre. En l'últim apartat (apartat 4.6) estudiem globalment la composició de les algues.

4.1 Contingut en matèria mineral

El rang dels resultats d'aquest treball oscil·la entre 20.81 i 25.54% (sms) que són lleugerament menors als resultats trobats en l'estudi de Mata et al. (2016) sobre *Ulva ohnoi*, on el rang de matèria mineral trobat va ser 24.5- 39.5 % (sms). En altres estudis fets de l'alga *Ulva lactuca*, s'ha obtingut un contingut de matèria mineral de 17-22% (sms) (Ben-Ari et al., 2014) i 19.9-22.1% (Msuya i Neori, 2010).

Els resultats sobre el contingut mineral de l'alga *Ulva Ohnoi* cultivada en diferents condicions s'inclouen en les figures 4.1-1, 4.1-2 i 4.1-3 d'acord als tres experiments successius. En aquestes gràfiques es representa la mitjana del resultat de l'anàlisi de cada mostra i les barres d'error correspon a la desviació estàndard de les rèpliques realitzades en l'anàlisi.

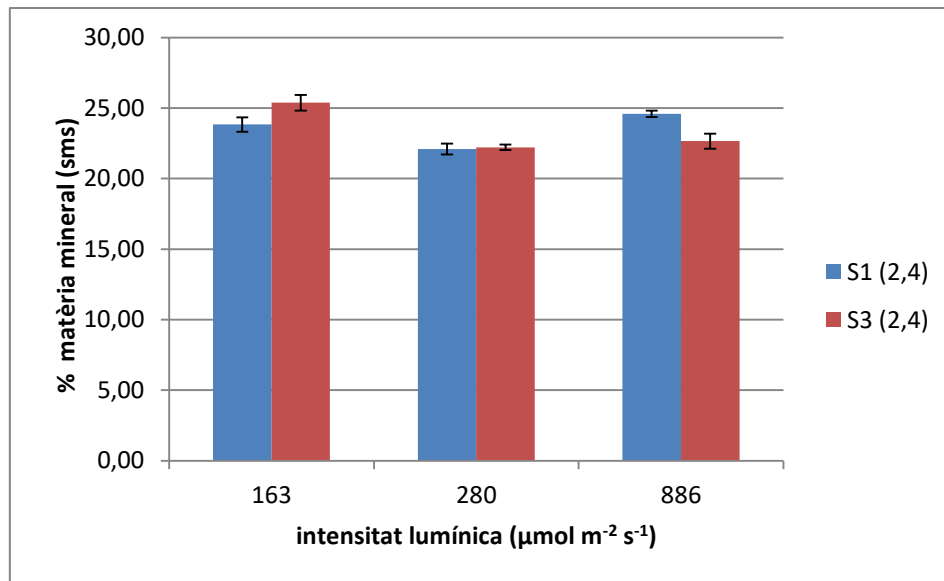


Figura 4.1-1: Resultats del contingut en matèria mineral de *Ulva Ohnoi* per la densitat de cultiu de 2,4 Kg m⁻² i diferents intensitats lumíniques per les setmanes 1 (S1) i 3 (S3) de l'experiment 1.

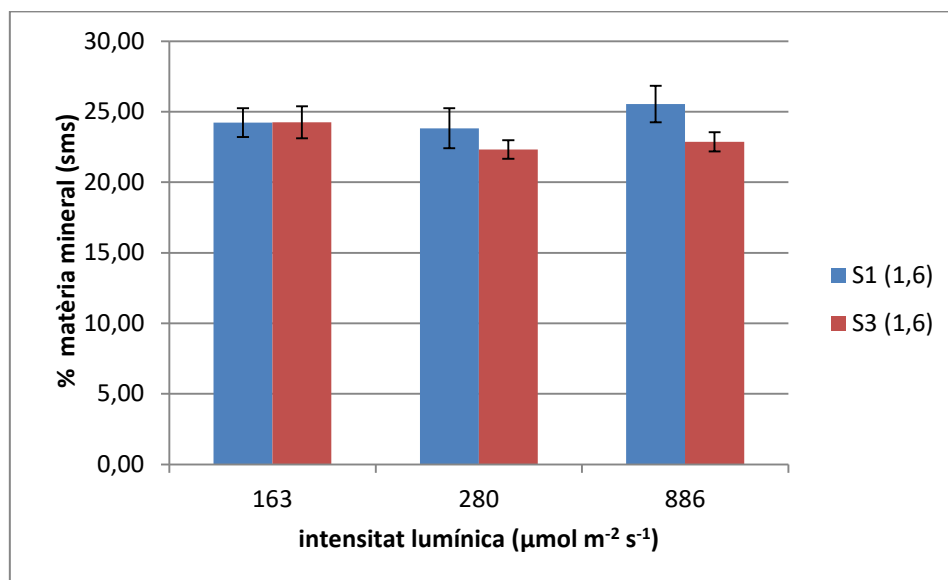


Figura 4.1-2: Resultats del contingut de matèria mineral de *Ulva Ohnoi* per la densitat de cultiu de 1,6 Kg m⁻² i diferents intensitats lumíniques per les setmanes 1 (S1) i 3 (S3) de l'experiment 2.

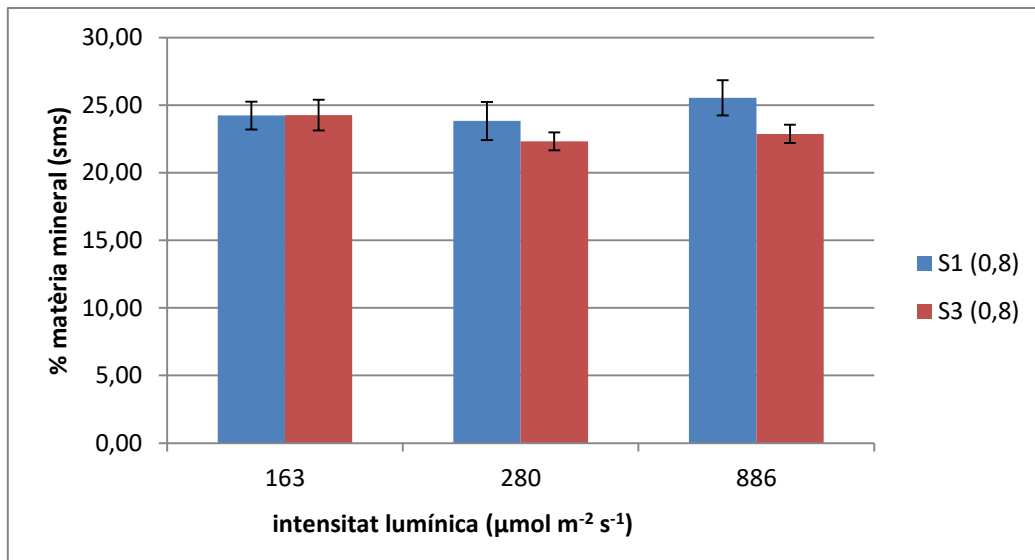


Figura 4.1-3: Resultats del contingut de matèria mineral de *Ulva Ohnoi* per la densitat de cultiu de $0,8 \text{ Kg m}^{-2}$ i diferents intensitats lumíniques per les setmanes 1 (S1) i 3 (S3) de l'experiment 3.

Pel que fa a l'evolució del contingut entre les mostres inicial i final el contingut de matèria mineral, sembla que es manté amb poques variacions. Si s'analitza separant les dades per densitats es pot apreciar que quan la densitat de cultiu és 2.4 Kg m^{-2} les diferències entre la setmana 1 i 3 són petites. Quan la densitat de cultiu és de 1.6 Kg m^{-2} a intensitat baixa ($163 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) l'evolució en el temps no es pot apreciar i, a més intensitat lumínica es pot considerar que hi ha una descendent més marcada. En el cas de d'una densitat de cultiu baixa, 0.8 Kg m^{-2} (Figura 4.1-3), a intensitats lumíniques baixa i mitjana, 163 i $280 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la tendència en el temps es manté descendent però en intensitat alta, $886 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, l'evolució és creixent.

Globalment, no s'observa una evolució general molt evident i les variacions detectades semblen en general poc significatives si tenim en compte la desviació estàndard de la mitjana. La poca variació observada en el contingut de matèria mineral entre les mostres inicials i finals de cada experiment ens permet estudiar l'efecte de les condicions de cultiu a través dels valors de les mitjanes de les setmanes 1 i 3 (taula 4.1-1).

Taula 4.1-1: Resultats del contingut en matèria mineral de *Ulva Ohnoi* per les diferents condicions de densitat de cultiu i intensitat lumínica: valors de la mitjanes de les setmanes 1 i 3 de cada experiment.

Materia mineral (% sms)	Il·luminació			
Densitat	163 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	280 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	886 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Mitjana
2,4 Kg m ⁻²	24,61	22,15	23,62	23,46 ^a
1,6 Kg m ⁻²	24,24	23,07	24,21	23,84 ^a
0,8 Kg m ⁻²	23,02	22,57	22,71	22,77 ^a
Mitjana	23,96 ^a	22,60 ^a	23,51 ^a	

En una mateixa fila o columna, mitjanes seguides de lletres diferents indica que hi ha diferència significativa d'acord al test Tukey amb un 95% de confiança.

Encara que els valors més alts en contingut de matèria mineral coincideixen amb les condicions de cultiu de menor intensitat lumínica i major densitat, d'acord al test de Tukey no hi ha diferències significatives en el contingut de matèria mineral en l'alga cultivada en diferents condicions

4.2 Contingut en fòsfor

En el conjunt de mostres d'alga analitzades, el rang de valors trobat, és 238.65- 389.64 mg P 100g⁻¹ sms ; aquest resultat és semblant al trobat en contingut de fòsfor d'*Ulva Lactuca* en l'estudi de Msuya i Neori (2010) de 180-370mg P100g. Els resultats sobre el contingut en fòsfor de l'alga *Ulva Ohnoi* cultivada en diferents condicions s'inclouen en les figures 4.2-1, 4.2-2 i 4.2-3 d'acord als tres experiments successius. En aquestes gràfiques es representa la mitjana del resultat de l'anàlisi de cada mostra i les barres d'error correspon a la desviació estàndard de les rèpliques realitzades.

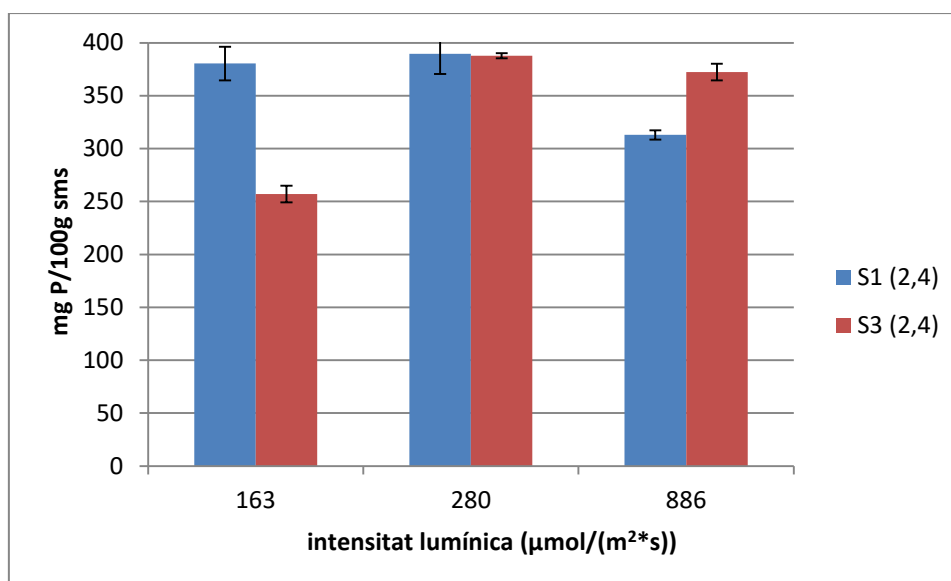


Figura 4.2-1: Resultats de fòsfor de *Ulva Ohnoi* per la densitat de cultiu de 2,4 Kg/m² i diferents intensitats lumíniques per les setmanes 1 i 3 de l'experiment 1.

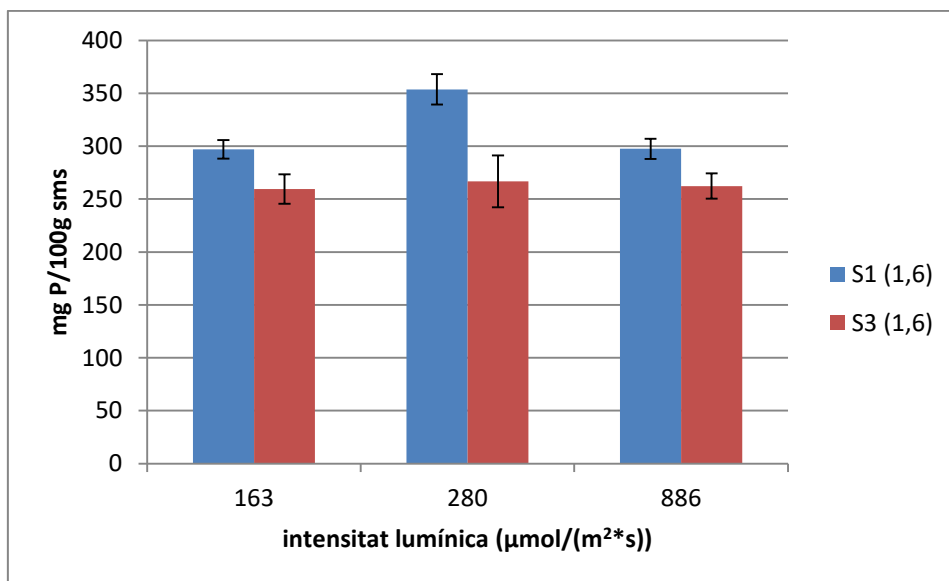


Figura 4.2-2 Resultats de fòsfor de *Ulva Ohnoi* per la densitat de cultiu de 1,6 Kg/m² i diferents intensitats lumíniques per les setmanes 1 i 3 de l'experiment 2.

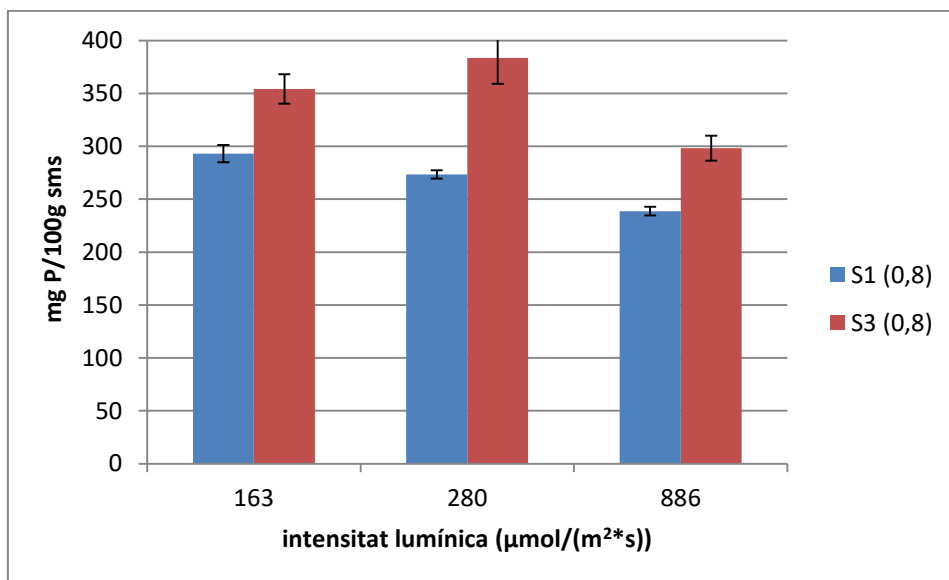


Figura 4.2-3: Composició en mg 100g⁻¹ de fòsfor, sobre mostra seca, en densitat de cultiu de 0,8 Kg m⁻² i diferents intensitats lumíniques (163,280 i 886 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$) en la setmana 1 i 3 de l'experiment 3.

En l'evolució del contingut de fòsfor en el temps, a una densitat de cultiu de 2.4 Kg m^{-2} , es pot observar que a intensitat lumínica baixa ($163 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) hi ha un decreixement molt pronunciat que no és degut a l'efecte de la densitat de cultiu o la intensitat lumínica. També cal mencionar que a una densitat de cultiu de 2.4 Kg m^{-2} , i intensitat lumínica mitjana ($280 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) no hi ha una evolució apreciable, en canvi, quan la intensitat és alta ($886 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) es pot veure un augment.

En el cas de la densitat de cultiu 1.6 Kg m^{-2} l'evolució és decreixent independentment de la intensitat lumínica. Seguidament, en els cultius amb densitat 0.8 Kg m^{-2} l'evolució, en contrast amb l'anterior, és creixent.

La variació del contingut en fòsfor de l'alga entre les setmanes S1 i S3 dels experiments 1 i 3 sembla important i destaca especialment la detectada en les procedent del tanc que les mantenia a una densitat de cultiu de 2.4 Kg m^{-2} i intensitat lumínica baixa $163 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Donat que els tres tancs presenten la mateixa fluctuació, més acusada en l'experiment 1 (decreixent en el cas de la densitat mitjana i creixent en la densitat baixa) podem pensar que pot està relacionat amb el contingut de fòsfor en l'aigua. Es pot veure tendència decreixent i després creixent en la fluctuacions del contingut en fòsfor a l'aigua (figura 3.2.1-1).

Els valors mínims de P en el tanc R1 ($886 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) pot estar relacionat amb les altes extraccions que es van donar d'aquest nutrient en ser molt més elevada la producció amb el màxim d'il·luminació, per les densitats alta i intermitja.

Degut a la diferencia de concentracions de fòsfor no es pot fer la mitjana dels resultats de la primera setmana amb els de la tercera i, conseqüentment avaluem només l'efecte de les condicions de cultiu a partir dels valors en les mostres finals (S3).

En la tercera setmana de cultiu (taula 4.2-1) no s'observa cap tendència significativa. Els mínims s'assoleixen a altes o mitjanes densitats i il·luminació baixa o bé, a baixes o mitjanes densitats i il·luminació alta. Sembla que les mostres en condicions més extremes tenen el contingut en fòsfor més baix. El valor màxim de contingut en fòsfor, es detecta en la densitat de cultiu més alta i intensitat lumínica mitjana. En el cas del mínim valor de contingut de fòsfor en la mostra es dona en condicions de cultiu de densitat 2.4 Kg m^{-2} i intensitat lumínica $163 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Taula 4.2-1: Resultats de fòsfor (mitjana i desviació estàndard) de *Ulva Ohnoi*, per les diferents condicions de cultiu, densitat de cultiu i intensitat lumínica valors de la setmana 3.

mg P 100g ⁻¹ fòsfor (sms)	Il·luminació		
Densitat	163 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	280 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	886 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
2,4 Kg m ⁻²	257,1±7,9	387,8±2,3	372,4±7,8
1,6 Kg m ⁻²	259,5±13,9	266,9±24,5	262,3±11,9
0,8 Kg m ⁻²	354,2±6,9	383,6±8,7	298,2±9,6

S'observa que el contingut de fòsfor minva en condicions extremes de poca il·luminació i alta densitat o bé d'alta il·luminació i baixa densitat.

4.3 Contingut en Nitrogen orgànic

El contingut de nitrogen orgànic de les algues d'aquest estudi es troben en un rang de 3.10 - 4.05% N sms amb una mitjana de 3.53% N sms. Són similars als obtinguts per Ferrer (2016) que va obtenir un rang de resultats de 3.30 – 4.34 % amb una mitjana de 3.64% N sms. Ha estat difícil trobar altres fonts bibliogràfiques que expressin els resultats de la composició de les algues en nitrogen orgànic i nítric per separat. Tenint en compte que els resultats de nitrogen orgànic són notablement superiors als de nitrogen nítric, es podria comparar els valors de nitrogen orgànic d'aquest projecte i el nitrogen total (nitrogen orgànic i nitrogen nítric) de fonts bibliogràfiques consultades. Així també es pot veure com el contingut en nitrogen orgànic d'aquest treball són similars al contingut de nitrogen total en l'estudi sobre l'alga *Ulva ohnoi* de Mata (2016), que va obtenir un rang de 3.3- 4.7 % N sms.

Els resultats obtinguts en la anàlisi del contingut en nitrogen orgànic de l'alga *Ulva Ohnoi* cultivada en diferents condicions s'inclouen en les figures 4.1-1, 4.1-2 i 4.1-3 d'acord als tres experiments successius. En aquestes gràfiques es representa la mitjana del resultat de l'anàlisi de cada mostra i les barres d'error correspon a la desviació estàndard de les rèpliques realitzades.

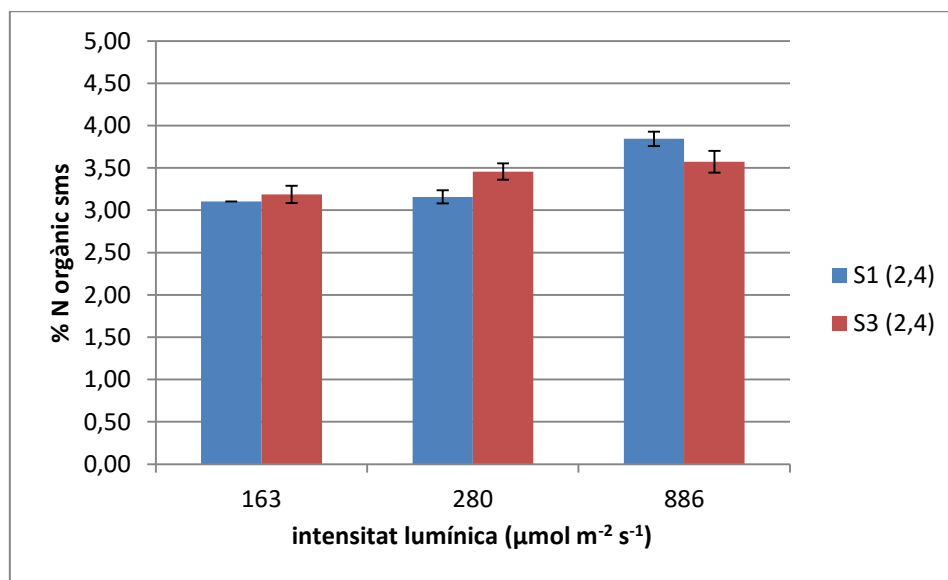


Figura 4.3-1: Resultats de nitrogen orgànic de *Ulva Ohnoi* per la densitat de cultiu de $2,4 \text{ Kg m}^{-2}$ i diferents intensitats lumíniques per les setmanes 1 i 3 de l'experiment 1.

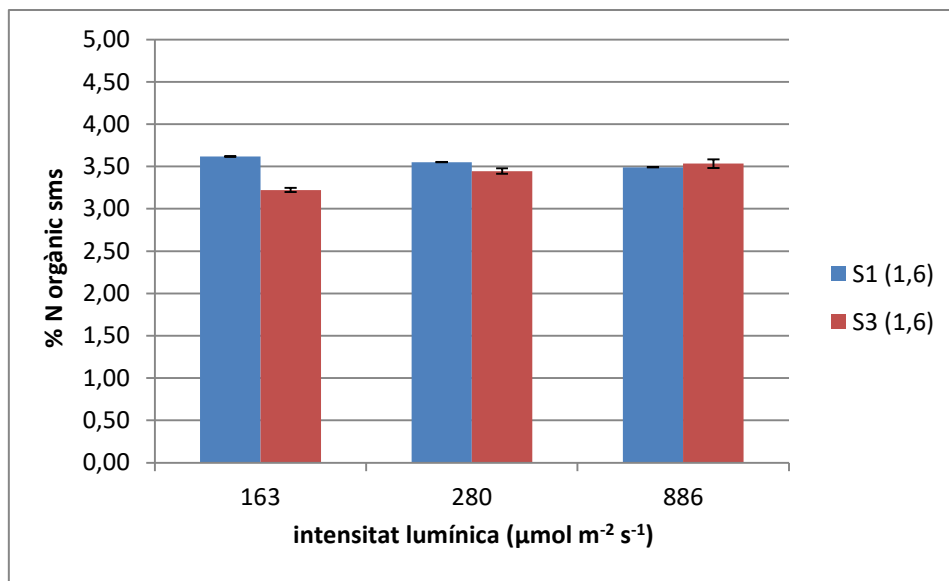


Figura 4.3-2: Resultats de fòsfor de *Ulva Ohnoi* per la densitat de cultiu de 1,6 Kg m⁻² i diferents intensitats lumíniques per les setmanes 1 i 3 de l'experiment 2.

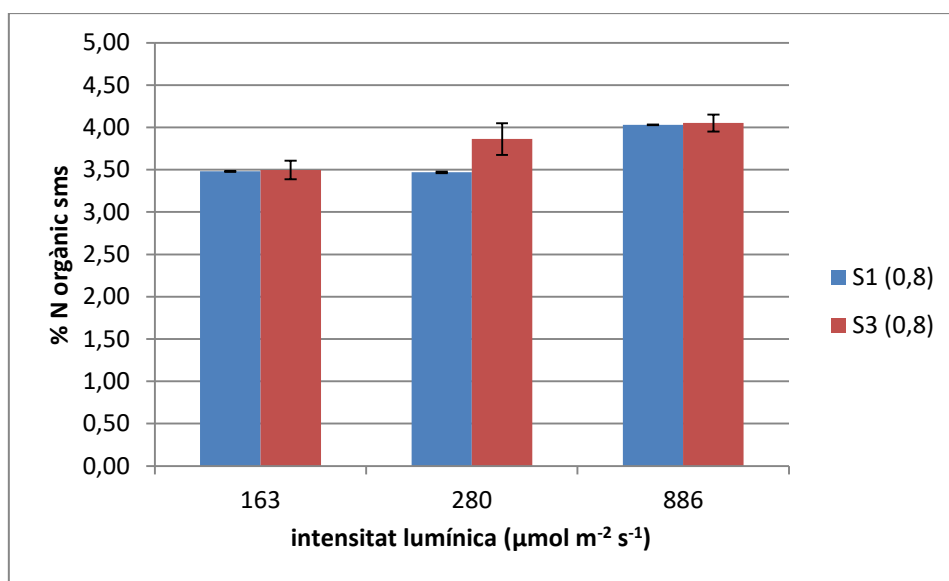


Figura 4.3-3: Resultats de fòsfor de *Ulva Ohnoi* per la densitat de cultiu de 0,8 Kg m⁻² i diferents intensitats lumíniques per les setmanes 1 i 3 de l'experiment 3.

En observar el nitrogen orgànic en les mostres cultivades en densitat de 2.4 Kg m⁻² la concentració de nitrogen orgànic tant de la setmana 1 com de la setmana 3 en diferents condicions lumíniques resulta que a més intensitat, més nitrogen orgànic conté la mostra. En la figura 4.3-2 (en densitat de cultiu 1.6 Kg m⁻²) no s'observa una tendència molt clara. El nitrogen orgànic de les mostres a la setmana 1 decreix en augmentar la intensitat lumínica mentre que el de les mostres preses a la setmana 3 creix. En el cas dels cultius a densitat 0.8 Kg m⁻² (Figura

4.3-3), valorant per setmanes, en els dos casos sembla que com més intensitat reben, més nitrogen capten.

Degut a la poca variació observada permet estudiar l'efecte de les condicions de cultiu a través dels valors de les mitjanes (taula 4.3-1).

Taula 4.3-1: Resultats de nitrogen orgànic de *Ulva Ohnoi* per les diferents condicions de cultiu, densitat de cultiu i intensitat lumínica. Valors de la mitjanes de les setmanes 1 i 3 dels experiments

%N org sms	Il·luminació			
Densitat	163 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	280 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	886 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	Mitjana
2,4 Kg m ⁻²	3,15	3,31	3,71	3,39 ^b
1,6 Kg m ⁻²	3,42	3,50	3,51	3,48 ^{ab}
0,8 Kg m ⁻²	3,49	3,67	4,04	3,73 ^a
Mitjana	3,35 ^b	3,49 ^{ab}	3,75 ^a	

En una mateixa fila o columna, mitjanes seguides de lletres diferents indica que hi ha diferència significativa d'acord al test Tukey amb un 95% de confiança.

A partir del test de Tukey es pot afirmar que el contingut de nitrogen orgànic de les mostres dels tancs amb densitat de 2.4 Kg m⁻² es significativament inferior comparant-lo amb el contingut de nitrogen orgànic de les mostres amb densitat de cultiu de 0.8 Kg m⁻². Tenint en compte la intensitat lumínica, els resultats són semblants: es pot afirmar que existeix una diferència significativa en el contingut de nitrogen orgànic entre la mostra cultivada amb intensitat més alta i la mostra cultivada amb intensitat més baixa.

4.4 Contingut en nitrats

El contingut de nitrats, expressat com a N-nítric i sobre matèria seca, en les algues d'aquest estudi oscil·la entre un rang de 0.21 – 0.38 % amb una mitjana de 0.33%. Són similars als obtinguts per Ferrer (2016) que va obtenir un rang de resultats de 0.10 – 0.31% N-nítric sms.

Els resultats obtinguts en l'anàlisi del contingut en nitrogen nítric de l'alga *Ulva Ohnoi* cultivada en diferents condicions s'inclouen en les figures 4.4-1, 4.4-2 i 4.4-3 d'acord als tres experiments successius. En aquestes gràfiques es representa la mitjana del resultat de l'anàlisi de cada mostra i les barres d'error correspon a la desviació estàndard de les rèpliques realitzades.

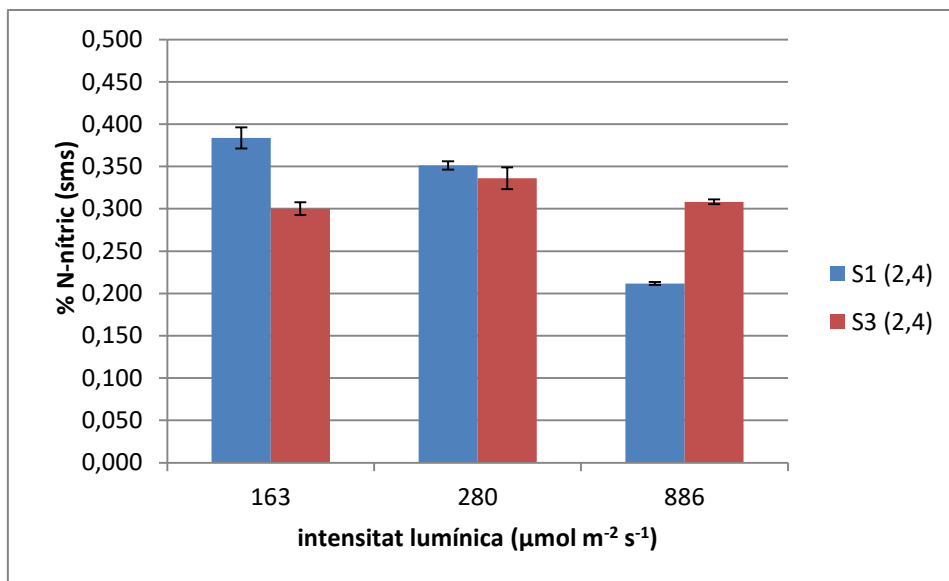


Figura 4.4-1: Resultats de nitrogen nítric de *Ulva Ohnoi* per la densitat de cultiu de 2,4 Kg m⁻² i diferents intensitats lumíniques per les setmanes 1 i 3 de l'experiment 1.

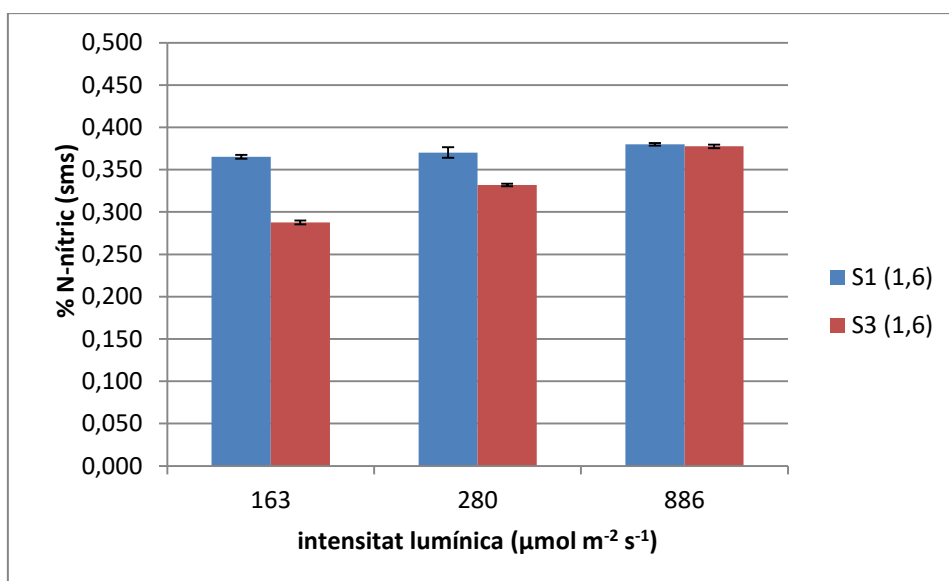


Figura 4.4-2: Resultats de nitrogen nítric de *Ulva Ohnoi* per la densitat de cultiu de 1,6 Kg m⁻² i diferents intensitats lumíniques per les setmanes 1 i 3 de l'experiment 2.

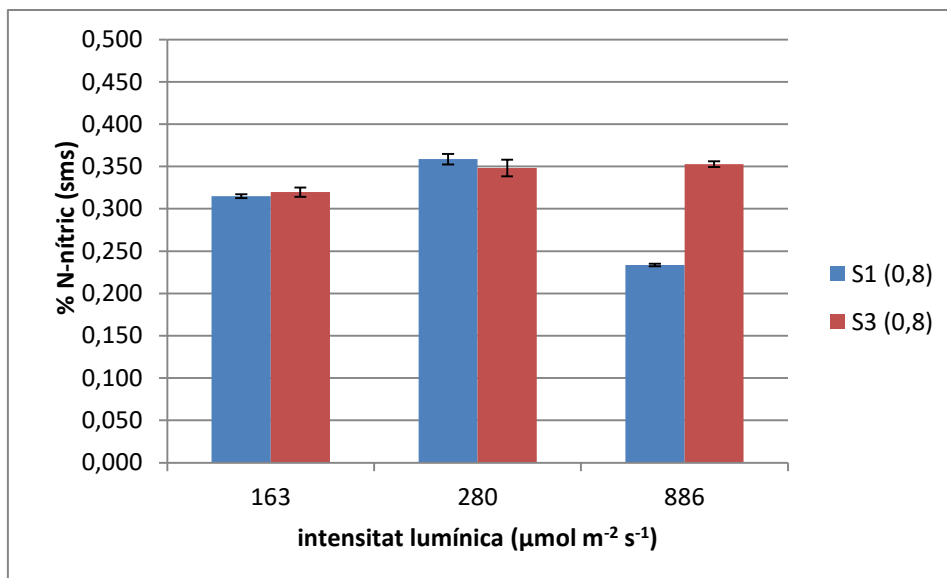


Figura 4.4-3: Resultats de nitrogen nítric de *Ulva Ohnoi* per la densitat de cultiu de $0,8 \text{ Kg m}^{-2}$ i diferents intensitats lumíniques per les setmanes 1 i 3 de l'experiment 3.

En general, la variació temporal dels experiments no presenten una tendència clara en contingut de nitrogen nítric. En el cultiu amb densitat de 2.4 Kg m^{-2} , el contingut de nitrat en les mostres no sembla que segueixi cap tendència. En observar el contingut de nitrogen nítric en cultius de densitat de 1.6 Kg m^{-2} es pot apreciar que, en les mostres recollides la tercera setmana, l'augment de captació de nitrogen nítric és més notable que a la primera setmana, però ambdós casos denoten una relació directa amb la intensitat de la llum aportada, és a dir, a més intensitat, major contingut de nitrogen nítric. En el cas dels cultius a una densitat de 0.8 Kg m^{-2} , el contingut en les mostres de la tercera setmana augmenta lleugerament amb la llum encara que els valors són molt semblants a totes tres intensitats lumíniques.

Degut a les fluctuacions de concentracions de nitrats no es pot fer la mitjana dels resultats de la primera setmana amb els de la tercera i, conseqüentment avaluem només l'efecte de les condicions de cultiu a partir dels valors en les mostres finals (S3).

En la tercera setmana de cultiu (taula 4.4-1) no s'observa cap tendència. El contingut decreix en el experiment 2 i augmenta en el 3 en intensitat lumínica baixa i mitjana, en canvi a intensitat lumínica alta passa el contrari. A la figura 3.2.1-2 s'observa com el contingut de N a l'aigua fluctua de la mateixa manera que els nitrats a les mostres d'intensitats baixa i mitjana. S'observa el contrari en les mostres d'intensitat lumínica alta. Això podria indicar que el contingut de nitrats en les mostres, es veu afectat pel contingut de nitrogen a l'aigua.

Taula 4.4-1 Resultats de nitrogen nítric(mitjana i desviació estàndard) de *Ulva Ohnoi*, per les diferents condicions de cultiu, densitat de cultiu i intensitat lumínica valors de la setmana 3 dels experiments.

% N nítric sms	II-luminació		
Densitats	163 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	280 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	886 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
2,4 Kg m ⁻²	0,300±0,012	0,340±0,013	0,310±0,003
1,6 Kg m ⁻²	0,290±0,002	0,330±0,001	0,380±0,002
0,8 Kg m ⁻²	0,320±0,006	0,350±0,010	0,350±0,003

Els valors de contingut de nitrats són correctes segons el reglament (UE) 1258/2011. Aquests compleixen els valors màxims permesos per la normativa europea en vegetals (2000-5000mg NO₃ Kg⁻¹ smh, depenent de la forma de cultiu i de l'època) ja que aquests valors màxims representen entre 400-1100 mg N- nítric/100g sms si considerem un 10% de matèria seca.

4.5 Contingut de Nitrogen total i valors de les relacions N/P i C/N

4.5.1 Contingut de Nitrogen total

El rang de valors trobat és d'entre 3.49 i 4.41% de N sms, que entra en els rangs trobats en altres experiments com el de Mata et al. (2016) d'entre 3.3 i 4.7% N sms en *Ulva ohnoi*, Ben-Ari et al. (2014) d'entre 3.3 i 5.6% sms en *Ulva lactuca*, Naldi i Wheeler (1999) d'entre 2.4 i 4.7% (sms) en *Ulva fenestrata*, Ferrer (2016) de 3.38 a 4.46% sms en *Ulva ohnoi* i Toro (2018) que va trobar un rang de nitrogen total d'entre 3.5 i 4% N sms aproximadament.

Els resultats obtinguts en la anàlisi del contingut en nitrogen total de l'alga *Ulva Ohnoi* cultivada en diferents condicions s'inclouen en les figures 4.5-1, 4.5-2 i 4.5-3 d'acord als tres experiments successius. En aquestes gràfiques es representa la mitjana del resultat de l'anàlisi de cada mostra i les barres d'error correspon a la desviació estàndard de les rèpliques realitzades en l'anàlisi del N orgànic i el N nítric.

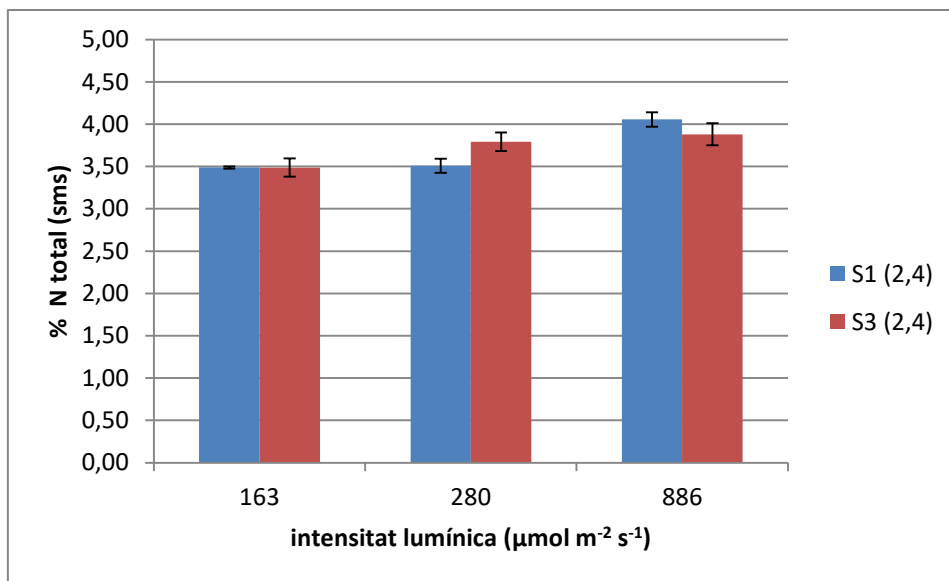


Figura 4.5-1: Resultats de nitrogen total de *Ulva Ohnoi* per la densitat de cultiu de $2,4 \text{ Kg m}^{-2}$ i diferents intensitats lumíniques per les setmanes 1 i 3 de l'experiment 1.

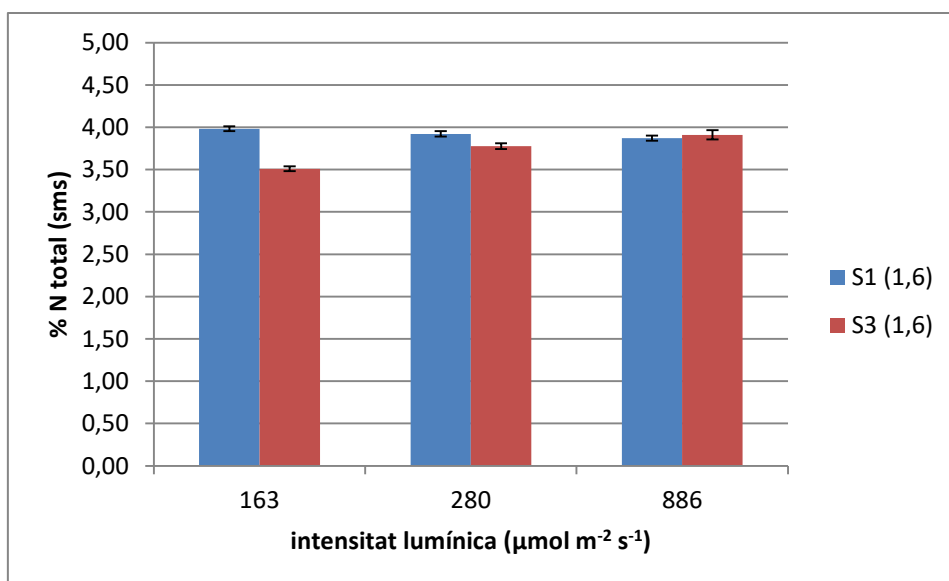


Figura 4.5-2: Resultats de nitrogen total de *Ulva Ohnoi* per la densitat de cultiu de $1,6 \text{ Kg m}^{-2}$ i diferents intensitats lumíniques per les setmanes 1 i 3 de l'experiment 2.

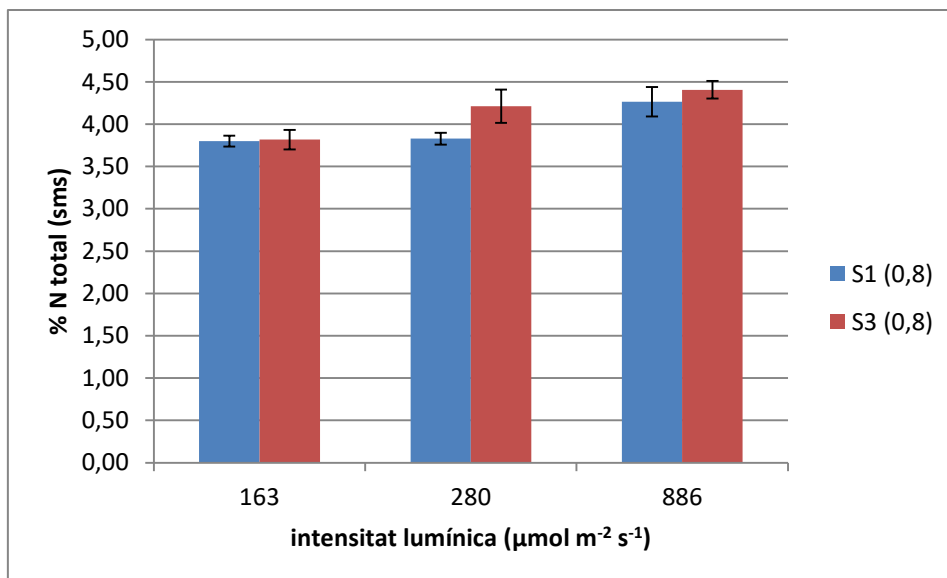


Figura 4.5-3: Resultats de nitrogen total de *Ulva Ohnoi* per la densitat de cultiu de 0,8 Kg m⁻² i diferents intensitats lumíniques per les setmanes 1 i 3 de l'experiment 3.

Els resultats en el contingut de l'alga en nitrogen total segueixen una tendència similar a la que s'ha observat en els resultats de nitrogen orgànic.

Com es pot observar, la diferencia en el contingut de nitrogen total entre la setmana 1 i 3 dels experiments no és molt acusat. Això permet estudiar l'efecte de les condicions de cultiu a través dels valors de les mitjanes (taula 4.5-1).

Taula 4.5-1: Resultats de nitrogen total de *Ulva Ohnoi* per les diferents condicions de cultiu, densitat de cultiu i intensitat lumínica valors de la mitjanes de les setmanes 1 i 3 dels experiments

%N total sms	Il·luminació			
Densitat	163 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	280 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	886 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Mitjana
2,4 Kg m ⁻²	3,49	3,65	3,97	3,70 ^b
1,6 Kg m ⁻²	3,75	3,85	3,89	3,83 ^{ab}
0,8 Kg m ⁻²	3,81	4,02	4,34	4,05 ^a
Mitjana	3,68 ^b	3,84 ^{ab}	4,06 ^a	

En una mateixa fila o columna, mitjanes seguides de lletres diferents indica que hi ha diferència significativa d'acord al test Tukey amb un 95% de confiança.

A partir del test de Tukey es pot afirmar que el contingut de nitrogen total es significativament diferent entre les mostres de densitat de cultiu de 2.4 i 0.8 (Kg m⁻²) però no es pot afirmar el mateix en el cas de les mostres de densitat 1.6 (Kg m⁻²).

Fent el mateix tractament estadístic però separant per intensitat lumínica, els resultats són semblants. Es pot afirmar que existeix una diferencia significativa en el contingut de nitrogen total entre la mostra cultivada amb intensitat més alta i la mostra cultivada amb intensitat més

baixa però no es pot afirmar que el resultat de cap d'aquestes dues mostres sigui significativament diferent a la mostra cultivada amb intensitat lumínica mitjana.

4.5.2 Relació entre els continguts en nitrogen i fòsfor i carboni i nitrogen de l'alga

A partir dels valors de contingut en C, N total i P de l'alga (expressada en percentatge p/p) s'han calculat els quocients N/P i C/N, en pes, ja que en la bibliografia consultada és habitual estudiar l'equilibri entre aquests nutrients. Aquesta relació pot indicar si existeix limitació de nutrients al medi.

La taula 4.5.2-2 mostra la relació de nitrogen total i fòsfor de les diferents condicions de cultiu, considerant les mitjanes entre les dues setmanes. Segons Atkinson i Smith (1983) el ratio N:P a les algues en general pren un rang d'entre 10:1 i 80:1 en pes, i la mitjana en aquest experiment, 12.58, es troba en aquest rang. Només tres valors, en densitat de cultiu 2.4 els valors són menors a 10:1. En un altre experiment (Bjornstater i Wheeler, 1990) sobre un cultiu de *U. fenestrata* s'obté un ratio òptim de N:P d'entre 16:1 i 24:1, el qual és major que els trobat en aquest experiment. Valors inferiors a 8-16 indiquen limitació de nitrogen i superiors a 12-24 indiquen limitació de fòsfor en *U. Fenestrata* (Buaped et al., 2008).

Taula 4.5.2-2: Relació N/P de *Ulva Ohnoi* per les diferents condicions de cultiu, densitat de cultiu i intensitat lumínica. Valors de la mitjanes de les setmanes 1 i 3 dels experiments.

N/P	II·luminació			
Densitat	163 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	280 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	886 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	Mitjana
2,4 Kg m ⁻²	11,37	9,39	11,69	10,82 ^a
1,6 Kg m ⁻²	13,47	12,62	13,96	13,35 ^a
0,8 Kg m ⁻²	11,87	12,49	16,32	13,56 ^a
Mitjana	12,24 ^a	11,50 ^a	13,99 ^a	

En una mateixa fila o columna, mitjanes seguides de lletres diferents indica que hi ha diferència significativa d'acord al test Tukey amb un 95% de confiança.

Les oscil·lacions observades són reflex de les que s'han obtingut en els resultats de contingut en fòsfor i nitrogen.

La taula 4.5.2-3 mostra la relació de carboni i nitrogen total de les diferents condicions de cultiu, considerant les mitjanes de les dues setmanes. El contingut de carboni fet servir per calcular aquests ratios es pot veure a la taula 3.4-5. A intensitat alta, en els cultius de totes tres densitats s'aprecia una disminució en la concentració de carboni en el temps mentre que a la resta d'intensitats s'observa com passa el contrari.

Els ratios C:N obtinguts en aquest projecte, oscil·len entre 6.44:1 i 8.41:1, amb una mitjana de 7.54:1. En l'estudi d'Atkinson i Smith (1983) es considera un ratio C:N òptim per *Ulva* sp. el de 8.23:1 en pes. També són < 10 coincidint amb un treball dut a terme amb *Ulva lactuca* (Tremblay-Gratton, 2017) però lleugerament menors a 8.5 i 8.78 com es determina en altres experiments amb *Ulva* spp. (Maze et al. (1993); Mendo et al. (2006) respectivament).

Taula 4.5.2-3: Relació C/N de *Ulva Ohnoi* per les diferents condicions de cultiu, densitat de cultiu i intensitat lumínica. valors de la mitjanes de les setmanes 1 i 3 dels experiments.

C/N	II-luminació			
Densitats	163 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	280 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	886 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	Mitjana
2,4 Kg m ⁻²	8,30	8,07	7,61	7,99 ^a
1,6 Kg m ⁻²	8,04	8,00	7,63	7,89 ^a
0,8 Kg m ⁻²	8,19	7,94	7,32	7,82 ^a
Mitjana	8,18 ^a	8,00 ^{ab}	7,52 ^b	

En una mateixa fila o columna, mitjanes seguides de lletres diferents indica que hi ha diferència significativa d'acord al test Tukey amb un 95% de confiança.

En la figura 3.4-3 s'observa una tendència ascendent, en el creixement, en augmentar la intensitat lumínica per a totes les densitats de cultiu i un decreixement en augmentar la densitat de cultiu per a intensitats lumíniques baixa i mitjana. El valor més alt correspon al cultiu de intensitat lumínica 886 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i a densitat de cultiu 1.6 Kg m⁻². En intensitat lumínica 886 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ el creixement és sensiblement major que a altres intensitats excepte en el cas en que la densitat de cultiu és baixa. A més a més, en aquest cas, s'ha observat com les algues s'han tornat d'un color groguenc (Oca J. et al., 2016).

4.6 Valoració global de la composició de les algues en funció de les condicions de cultiu

Els valors obtinguts en l'anàlisi del contingut de fòsfor, nitrogen orgànic i nitrogen total són en els rangs trobats a la bibliografia consultada. Els valors del contingut de matèria mineral són lleugerament inferiors, en alguns casos, però la diferència amb els valors trobats a altres estudis és petita. El mateix passa amb el contingut de nitrats, havent obtingut uns valors pròxims als consultats però lleugerament superiors en aquest cas. Tot i així compleixen el reglament (UE) 1258/2011.

Els valors dels ratios C/N són semblants al rang consultat a bibliografia mentre que els valors dels ratios N/P es situen a la part baixa del rang. Això podria indicar una possible limitació de nitrogen o bé excés de fòsfor a l'aigua en algun moment dels experiments. Encara que el nitrogen a l'alga pot ser afectat per diversos factors, tant biòtics com abiòtics (Barr, 2007).

La valoració dels efectes de les condicions de cultiu sobre la composició de les algues la elaborem a través dels resultats que s'han exposat per separat en els apartats anteriors, i els resultats provinents del control dels experiments (aigua, creixement i contingut en matèria seca).

D'acord al resultat de control dels experiments es pot veure que els tancs en els que s'aprecia un creixement més alt són els que tenen un percentatge més baix en matèria seca mentre que els percentatges més alts s'observen a els tancs on el creixement és mitjà o baix. Si s'observa el valor final en matèria seca de cada tanc, el tanc amb el percentatge més alt en matèria seca es el tanc en condicions 1.6 Kg m⁻² i 163 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, i el que registra un percentatge més baix és el tanc en condicions 0.8 Kg m⁻² i 886 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

La composició en matèria mineral és molt constant, només s'han observat diferències significatives en el cas del nitrogen orgànic i el nitrogen total, que indiquen que a més intensitat lumínica hi ha més contingut de nitrogen i a més densitat menys contingut. Així doncs en aquestes condicions la matèria seca és més rica en nitrogen orgànic en proporció al contingut de carboni. Sembla que el contingut en nitrogen total i la relació C/N podrien tenir relació amb el creixement i el contingut de matèria seca. Mentre que el contingut de nitrogen augmenta en incrementar la irradiació, com en el creixement, el contingut de matèria seca i la relació C/N varia de manera contrària, disminuint en augmentar la irradiació.

D'altra banda el contingut de fòsfor i nitrogen nítric fluctua però no es pot veure com depèn el contingut a l'alga en funció de les condicions de cultiu. Les fluctuacions observades podrien indicar que es veu més afectat pel contingut a l'aigua.

5. Conclusions

En aquest treball, s'ha analitzat el contingut de matèria mineral, fòsfor, nitrogen orgànic i nitrats de l'alga *Ulva Ohnoi* cultivada en diferents condicions (densitats de 0.8 Kg m^{-2} , 1 Kg m^{-2} , 1.6 Kg m^{-2} i intensitats lumíniques de 886, 280 i $163 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), en un sistema IMTA, a l'inici i el final dels experiments, que tenien una durada de 3 setmanes. Els valors trobats en els resultats de les anàlisis s'ajusten als valors de la bibliografia, a més a més els observats en la determinació de nitrats compleixen la normativa.

Les condicions de cultiu, densitat i intensitat lumínica, no es pot dir que afectin al contingut de matèria mineral, fòsfor o nitrats de l'alga. Únicament s'ha trobat relació entre el contingut en nitrogen i en la relació C/N de la mostra i les condicions de cultiu.

S'han trobat diferències significatives entre els valors de N de l'alga entre les condicions extremes de densitat i il·luminació ja que els valors són més alts a l'augmentar la intensitat lumínica i disminuir de la densitat. També s'han trobat diferències significatives entre els valors de C/N de l'alga entre les condicions extremes d'il·luminació observant els valors més baixos en augmentar la intensitat lumínica.

6. Bibliografia

- Aguilera J., Bischof K., Karsten U., Hanelt U , Wiencke C. (2002). Seasonal variation in ecophysiological patterns in macroalgae from an Arctic fjord. II. Pigment accumulation and biochemical defence systems against high light stress. *Marine biology*. 140(6): 1087-1095.
- Al-Hafedh, Y. S., Alam, A., i Buschmann, A. H. (2015). Bioremediation potential, growth and biomass yield of the green seaweed, *Ulva lactuca* in an integrated marine aquaculture system at the Red Sea coast of Saudi Arabia at different stocking densities and effluent flow rates. *Reviews in Aquaculture*, 7(3), 161–171.
- APROMAR,. (2014). Estudio general: Una primera aproximación al sector de las macroalga. 4-17 pp. Càdiz: APROMAR.
- Barr, N. G. (2007). Aspects of nitrogen metabolism in the green alga *Ulva* ; Developing an indicator of seawater nitrogen loading. University of Auckland, Ph.D. Thesis, 1994, 1–219.
- Beauchamp, E.. (2012). Effects of UV radiation and salinity on the intertidal macroalgae *Palmaria palmate* and *Ulva lactuca*; effects on photosynthetic performance, growth and pigments Plymouth Student Sci., 5 pp. 3-22.
- Bischof, K., D. Hanelt i C. Wiencke. (2000). UV-effects on photo-synthesis and related enzyme reactions of marine macro-algae. *Planta* 211: 555–562.
- Bischof, K., D. Hanelt, H. Tug, U. Karsten, P.E.M. Brouwer i C. Wiencke. (1998). Acclimation of brown algal photosynthesis to ultraviolet radiation in Arctic coastal waters (Spitsbergen, Norway). *Polar Biol.* 20: 388–395.
- McHugh, J.D. (2003). A guide to the seaweed industry (FAO). <http://www.fao.org/3/a-y4765e.pdf> (visitada el 20 de maig del 2017).
- Burford MA, Williams KC.(2001) The fate of nitrogenous waste from shrimp feeding. *Aquaculture*. 198(1-2):79–93.
- Casais, E. (2016). Desarrollo de cultivos de *Ulva*; (Ulvaes, Chlorophyta) como biofiltro en sistemas de AMTI. http://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/17407/CasaisCaamano_Eduardo_TFM_2016.pdf?sequence=2 (visitada el 3 de juliol del 2017).
- Casillas-Hernández, R., Nolasco-Soria, H., García-Galano, T., Carrillo-Farnes, O., Páez-Osuna, F. (2007). Water quality, chemical fluxes and production in semi-intensive Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) culture ponds utilizing two different feeding strategies. *Aquacultural Engineering*.;36(2):105–114.

- Copertino, M.D., Tormena, T., Seeliger, U. (2009). Biofiltering efficiency, uptake and assimilation rates of *Ulva clathrata* (Roth) J. Agardh (Chlorophyceae) cultivated in shrimp aquaculture waste water J. Appl. Phycol., 21 (1) pp. 31-45
- Coutinho, R., Zingmark, R.. (1993). Interactions of light and nitrogen on photosynthesis and growth of the marine macroalga *Ulva curvata* (Kützinger) De Toni. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 167, 11–19
- Crab R, Avnimelech Y, Defoirdt T, Bossier P, Verstraete W. (2007). Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. Aquaculture.270(1–4):1–14.
- Eggert, A. (2012). Seaweed responses to temperature, in: Wiencke, C. et al. (Ed.) Seaweed biology: Novel insights into ecophysiology, ecology and utilization. Ecological Studies, 219: pp. 47-66
- Ferrer, J. (2016). Composició de l'alga *Ulva ohnoi* : efectes de les condicions de cultiu. Treball de final de grau, UPC, Escola Superior d'Agricultura de Barcelona.
- Figuerola, F. L., Aguilera, J., i Niell, F. X. (1995). Red and blue light regulation of growth and photosynthetic metabolism in *Porphyra umbilicalis* (Bangiales, Rhodophyta). European Journal of Phycology, 30(1), 11–18.
- Figuerola, F. L. i Viñegla, B.. (2001). Effects of solar UV radiation on photosynthesis and enzyme activities (carbonic anhydrase and nitrate reductase) in marine macroalgae from southern Spain. Rev. Chil. Hist. Nat.. 74. 237-249.
- Focardi S, Corsi I, Franchi E. (2005). Safety issues and sustainable development of European aquaculture: new tools for environmentally sound aquaculture. Aquaculture International. 13(1-2):3–17.
- Fong, P., Boyer, K. E., Desmond, J. S., iZelder, J. B. (1996). Salinity stress, nitrogen competition and facilitation: what controls seasonal succession of 2 opportunistic green macroalgae. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 206(310), 203–221.
- Garbary, D. (1979). The Effects of Temperature on the Growth and Morphology of Some *Audouinella* Spp. (Acrochaetiaceae, Rhodophyta). Botanica Marina, 22(8).
- Gerard, V. A. (1997). THE ROLE OF NITROGEN NUTRITION IN HIGH-TEMPERATURE TOLERANCE OF THE KELP, *LAMINARIA SACCHARINA* (CHROMOPHYTA)1. Journal of Phycology, 33(5), 800–810.
- Gjedrem, T., Robinson, N., i Rye, M. (2012). The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: A review. Aquaculture, 350–353, 117–129.
- Govern de Canada. (2013). AQUACULTURE in Canada: Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) Integrated Multi-Trophic Aquaculture: A new approach. <http://publications.gc.ca/collections/collect> (visitada el dia 11 d'abril del 2018).

- Hayden, H. S., Blomster, J., Maggs, C. A., Silva, P. C., Stanhope, M. J., i Waaland, J. R. (2003). Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera. *European Journal of Phycology*, 38(3), 277–294.
- Helm, M. M., i Bourne, N. (2004). Hatchery culture of bivalves. A practical manual. FAO.
- Hiraoka, M., Shimada, S., Ohno, M., i Serisawa, Y. (2003). Asexual life history by quadriflagellate swimmers of *Ulva spinulosa* (Ulvales, Ulvophyceae).
- Jackson, C., Preston, N., Thompson, P.J., Burford, M. (2003). Nitrogen budget and effluent nitrogen components at an intensive shrimp farm. *Aquaculture*. 218(1–4):397–411.
- Karez, R., Engelbert, S., Kraufvelin, P., Pedersen, M. F., i Sommer, U. (2004). Biomass response and changes in composition of ephemeral macroalgal assemblages along an experimental gradient of nutrient enrichment. *Aquatic Botany*, 78(2), 103–117.
- Kirby, A., (2001). Marine Botany. www.mbari.org/staff/conn/botany/greens. (Visitada el 3 de febrer del 2018)
- Kirst, G. O., i Wiencke, C. (1995). ECOPHYSIOLOGY OF POLAR ALGAE. *Journal of Phycology*, 31(2), 181–199.
- Klimaitis, N. (2016). Influència de les condicions de cultiu en les taxes d'eliminació de N i P de la macroalga *Ulva ohnoi*. Treball final de grau, UPC, Escola Superior d'Agricultura de Barcelona.
- Kumari, P., Kumar, M., Gupta, V., Reddy, C. R. K., i Jha, B. (2010). Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs. *Food Chemistry*, 120(3), 749–757.
- Lapointe, B. E. (1987). Phosphorus- and nitrogen-limited photosynthesis and growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae) in the Florida Keys: an experimental field study *Mar. Biol.* 93: 561-568
- Lawton, R. J., Mata, L., de Nys, R., i Paul, N. A. (2013). Algal bioremediation of waste waters from land-based aquaculture using *Ulva*: selecting target species and strains. *PloS One*, 8(10), e77344
- Lee, R. E. (2008). *Phycology* (4th ed., pp. 24-26). Cambridge [England]: Cambridge University Press.
- Littler, M. M., i Littler, S. D. (2013). The nature of crustose coralline algae and their interactions on reefs. *Smithsonian Contribution to the Marine Sciences*, (39), 199–212.
- Lüning, K. (1990). Seaweeds: their environment, biogeography, and ecophysiology. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 71(1), 246.
- Lüning, K., i Dring, M. J. (1985). Action spectra and spectral quantum yield of photosynthesis in marine macroalgae with thin and thick thalli. *Marine Biology*, 87(2), 119–129.

- Martínez-Córdova LR, Enriquez-Ocaña F.(2007) Study of the benthic fauna in a discharge lagoon of a shrimp farm with special emphasis on polychaeta. *Journal of Biological Sciences*. 7:12–17.
- Masaló, I., Oca, J., Ferrer, J., Cremades, J., Pintado, J., Jimenez, P. (2016). Influence of growing conditions on *Ulva ohnoi* composition cultivated in an IMTA-RAS system. A: EAS2016-Food for thought. "EAS2016- Food for thought. Edinburgh 20-23 2016". UPC, Escola Superior d'Agricultura de Barcelona. Edinburgh: 2016, p. 623-624.
- Msuya, F. (2009). The Effect of Stocking Density on the Performance of the Seaweed *Ulva reticulata* as a Biofilter in Earthen Pond Channels, Zanzibar, Tanzania. *Western Indian Ocean Journal of Marine Science*, 6(1).
- Msuya, F. E., i Neori, A. (2008). Effect of water aeration and nutrient load level on biomass yield, N uptake and protein content of the seaweed *Ulva lactuca* cultured in seawater tanks. *Journal of Applied Phycology*, 20(6), 1021–1031.
- Msuya, F. E., i Neori, A. (2010). The performance of spray-irrigated *Ulva lactuca* (Ulvophyceae, chlorophyta) as a crop and as a biofilter of fishpond effluents. *Journal of phycology*, 46(4), 813-817.
- Ozaki, Al., Mizuta, H., Yamamoto, H. (2001) Physiological differences between the nutrient uptakes of *Kjellmaniella crassifolia* and *Laminaria japonica* (Phaeophyceae). *FishSci* 67:415–419 A model for the growth of mariculture kelp *Saccharina japonica* in Sanggou Bay, China .
- Pakker, H., Beekman, C.A.C., Breeman, A.M. (2000) Efficient photoreactivation of UV-BR-induced DNA damage in the sublittoral macroalga *Rhodomenia pseudopalmata* (Rhodophyta). *Eur J Phycol* 35:109–114
- Pakker, H., Breeman, A. M. (1996). Temperature responses of tropical to warm-temperate atlantic seaweeds. ii. evidence for ecotypic differentiation in amphi-atlantic tropical-mediterranean species. *European Journal of Phycology*, 31(2), 133–141.
- Rinde E., Sjøtun K.. (2005). Demographic variation in the kelp *Laminaria hyperborea* along a latitudinal gradient, *Marine Biology* , vol. 146 (pg. 1051-1062)
- Rorrer, G.L., Cheney, D.P. (2004). Bioprocess engineering of cell and tissue cultures for marine seaweeds. *Aquac. Eng.* 32, 11–41
- Sampath-Wiley, P.; Neefus, C. D.; Leland S. (2008). "Seasonal effects of sun exposure and emersion on intertidal seaweed physiology: Fluctuations in antioxidant contents, photosynthetic pigments and photosynthetic efficiency in the red alga *Porphyra umbilicalis* Kutzing (Rhodophyta, Bangiales)" *Journal of experimental marine biology and ecology*. 112.
- Schneider, O., Sereti, V., Eding, E.H., Verreth, J.A.J. (2005). Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*.32(3-4):379–401.

- Soto, D. (2009). Integrated Mariculture A Global Review. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 529.
- Taylor, R., Fletcher, R. L., i Raven, J. A. (2001). Preliminary Studies on the Growth of Selected "Green Tide" Algae in Laboratory Culture: Effects of Irradiance, Temperature, Salinity and Nutrients on Growth Rate. *Botanica Marina*, 44(4), 327–336.
- Toro, N. (2018). Influència del mètode d'agitació en el creixement d'un tanc d'algues (*Ulva ohnoi*) integrat en un sistema d'aqüicultura multitrofica (IMTA).
- Troell, M., Halling, C., Neori, A., Chopin, T., Buschmann, A. H., Kautsky, N., i Yarish, C. (2003). Integrated mariculture: Asking the right questions. *Aquaculture*, 226(1–4), 69–90.
- Valiela I, McClelland J, Hauxwell J, Behr PJ, Hersh D, Foreman K. (1997). Macroalgal blooms in shallow estuaries: controls and ecophysiological and ecosystem consequences. *Limnology and Oceanography*.;42:1105–1118.
- Wallentinus, I. (1984). Comparisons of nutrient uptake rates for Baltic macroalgae with different thallus morphologies. *Marine Biology*, 80(2), 215–225.

Annex

1. Procediments

En les taules següents es mostren els procediments en detall duts a terme al laboratori.

Taula A1-1: Procediment detallat de la determinació de matèria mineral sobre mostra seca.

Determinació de Matèria mineral	
Determinació del contingut en matèria mineral mitjançant el procés de calcinació (gravimetria indirecta).	
1	Instumental i material
	Balança analítica
	Gresols
	Forn mufla
	Placa calefactora per gresols
	Dessecador
2	Reactius
3	Procediment
	Pretractar els gresols a la mufla a 550°C durant 4h i deixar al dessecador
	Pesar els gresols buits
	Pesar al voltant de 1,5 g de mostra seca en el gresol utilitzant la balança analítica
	Precalcinar la mostra a la placa calefactora
	Introduir els gresols ja precalcinats a la mufla
	Tractar els gresols a la mufla a 550°C durant 14h
	Deixar refredar els gresols al dessecador
	Pesar els gresols amb la mostra calcinada
4	Càlculs
	Matèria mineral (=MM)
	Pes de la mostra seca inicial (g) (=Pi)
	Pes final de la mostra (g) (=Pf)
	Pes del gresol buit (g) (=T)
	$\%MM = ((Pf - T) / Pi) \cdot 100$
5	Observacions
	Fer 3 repliques de cada mostra
	Abans d'utilitzar els gresols, comprovar que no tinguin cap esquerda deixant-los amb aigua sobre un paper de filtre

Taula A1-2: Procediment detallat de la determinació de fòsfor sobre mostra seca.

Determinació de Fòsfor	
La quantificació del fòsfor a partir de solucions de cendres de la mostra i mitjançant la colorimetria de Bray-Kurtz.	
1	Instumental i material
	Bany de sorra
	Pipetes de 10 mL i 2,5 mL
	Matrassos aforats de 50 mL i embuts petits
	Paper de filtre sense cendres

	<p>Tubs Falcon</p> <p>Colorímetre</p> <p>Tubs d'assaig</p> <p>Agitador de tubs</p>
2	<p>Reactius</p> <p>Àcid nítric (HNO_3 3M) (315,05 g d'HNO_3 60% comercial enrasats en 1 L d'aigua destil·lada)</p> <p>Reactiu A (20g $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ en 170mL d'aigua i afegir la solució de 340mL HCl i 32mL d'aigua)</p> <p>Reactiu B (6 g de la barreja de reactiu B de Bray molturada (àcid 1,2,3aminonaftolsulfònic, disulfid i sulfid de sodi anhidre) en 80 mL d'aigua calenta i, posteriorment afegir 20 mL, per arribar als 100mL)</p> <p>Solució mare de fòsfor 100 P ppm (0,5613g K_2HPO_4 assecat 1h a 105C en un litre)</p> <p>Solució de fòsfor 20 ppm (200mL fins a 1000mL)</p> <p>Solucions patró de fòsfor de 1, 2, 4 i 10 mg P/L (pipetejar 2,5mL, 5mL, 10mL i 25mL i enrasar a 50mL)</p>
3	<p>Procediment</p> <p>Obtenció de solució de cendres</p> <p>Afegir a poc a poc, a les cendres, 15 mL d'àcid nítric HNO_3 3 M mesurats amb una proveta</p> <p>Posar els gresols amb l'àcid sobre un bany de sorra durant 20-30 minuts amb ebullició suau</p> <p>Filtrar les cendres amb un embut, paper de filtre i vareta</p> <p>Recollir el filtrat en un matràs aforat de 50 mL</p> <p>Enrasar amb aigua destil·lada</p> <p>Agitar i guardar en tubs falcon</p> <p>Colorimetria de Bray-Kurtz</p> <p>Fer una dilució 1/20: diluir les solucions de cendres pipetejant 2,5 mL i enrasat amb aigua destil·lada en un matràs de 50 mL</p> <p>Abocar el contingut a tubs falcons nous</p> <p>Pipetejar 10 mL de cada patró i 10 mL d'aigua destil·lada (blanc) en tubs d'assaig</p> <p>Pipetejar 10 mL de cada solució diluïda preparada anteriorment en tubs d'assaig</p> <p>Afegir 10 gotes de reactiu A a tots els tubs d'assaig</p> <p>Afegir 10 gotes de reactiu B a tots els tubs d'assaig</p> <p>Agitar els tubs i esperar 15 minuts</p> <p>Ajusta el colorímetre a 660nm i introduir el tub d'assaig amb el blanc per assignar l'absorbància d'aquest amb valor zero</p> <p>Llegir l'absorbància dels patrons i de les mostres</p> <p>Fer recta a partir de la lectura dels patrons i realitzar els càlculs</p>
4	<p>Càlculs</p> <p>Extreure la recta patró de la gràfica.</p> <p>Aïllar la concentració de fòsfor en la solució diluïda (=x)</p> <p>Multipliquem pel factor de dilució (=F)</p> <p>Pes en g de la mostra seca posada a calcinar (=p)</p> <p>$\text{mgP}/100\text{g sms} = (x \cdot F \cdot 0,05 \cdot 100)/p$</p>
5	<p>Observacions</p> <p>Fer 3 repliques de cada mostra</p> <p>En filtrar, assegurar-se que no es produeixen pèrdues</p> <p>La solució de cendres guardada als falcons es poden deixar a la nevera</p>

Taula A1-3: Procediment detallat de la determinació de nitrogen orgànic sobre mostra seca.

Determinació de Nitrogen orgànic	
El nitrogen orgànic total es converteix en amoni amb àcid sulfúric en presència d'un catalitzador. El digerit posteriorment es neutralitza amb una base i es destil·la. El destil·lat es recull sobre HCl i es fa una valoració, amb NaOH estandarditzat, per determinar el HCl que no ha reaccionat.	
1	Instrumental i material
	Digestor i Destil·lador
	Tubs Kjeldhal
	Erlenmeyers
	Paper de fumar
	Balança analítica
	Bureta
2	Reactius
	Pastilles de catalitzador Kjeldhal (Pes de 4g i composició de 9% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0,9% Se)
	H_2SO_4 concentrat (riquesa del 96% p/p i densitat (p/v) = 1,84 g/mL)
	NaOH 40%
	HCl 0,1 M
	NaOH 0,1 M normalitzada (valorant amb HCl comercial d'exactament 0,1M es calcula el factor)
	HCl comercial de concentració coneguda 0,1M
	Roig de Metil
	Patró Acetanilida (N-fenil acetamida) $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}$ (135,17 g/mol i 10% N)
3	Procediment
	Digestió
	Pesar 0,2500g de mostra seca i molturada amb la balança analítica, en paper de fumar
	Embolcar el paper i transportar-lo fins al tub Kjeldhal
	Introduir una pastilla de catalitzador al tub
	Afegir 7ml de H_2SO_4 amb el dosificador
	Introduir les mostres al digestor durant 1h a 400°C
	Treure els tubs i un cop refredats afegir aigua destil·lada fins uns volum final de 25mL
	Destil·lació-Fixació
	Preparar erlenmeyers amb 20mL de HCl (0,1 M) i tres gotes d'indicador
	Col·locar un erlenmeyer a la sortida del destil·lador i un tub Kjeldhal a l'entrada
	Prémer el botó que afegeix 50 mL de NaOH (40%) al tub
	Prémer el botó de vapor d'aigua per començar la destil·lació
	Aturar la destil·lació un cop passats els 7 minuts
	Valoració
	Valorar amb NaOH 0,1 M normalitzada (per triplicat) 20 mL de HCl i 3 gotes d'indicador com a blanc
	Treure l'erlenmeyer del destil·lador
	Valorar amb NaOH 0,1 M normalitzada
4	Càlculs
	mL de NaOH per fer virar el color de l'indicador en l'estandardització de la solució de HCl (=Vb)
	mL de NaOH per fer virar el color de l'indicador en la valoració de la mostra (=Vm)
	g de la mostra posada a digerir (=g)
	%N sms = $(V_b - V_m) \cdot \text{factor del NaOH} \cdot 0,14/p$
	%Proteïna = $6,25 \cdot \%N_{\text{org}}$
5	Observacions
	Cal fer 3 repeticions per cada mostra

Després de la digestió, el contingut dels tubs pren un color blau verdós transparent

Després de la digestió, un cop refredat afegir aigua destil·lada per evitar la solidificació del contingut

Abans de fer servir el destil·lador, fer passar aigua destil·lada. Repetir després de cada 3 mostres

Per destil·lar i valorar, utilitzar ulleres protectores

En cas de no saber el factor de NaOH, fer valoració amb HCl comercial de concentració 0,1M

Per fer el blanc, es fan tres valoracions sense mostra i es fa la mitjana dels tres resultats

Per comprovar que la digestió i la destil·lació són correctes periòdicament es realitza l'anàlisi de acetanilida com a patró. Es pesen 0,1g de reactiu

Taula A1-4: Procediment detallat de la determinació de nitrogen nítric sobre mostra seca.

Determinació de Nitrogen nítric	
Quantificació potenciomètrica dels nitrats en un extracte mitjançant un elèctrode selectiu. L'elèctrode selectiu de nitrats és de membrana polimèrica (model 9662S7 CRISON) amb escala lineal de treball de 3ppm a 6,2g/l de N-nítric i pendent de $55 \pm 4 \text{ mV}$ a $20 \pm 5^\circ \text{C}$ i es connecta al potenciòmetre junt amb l'elèctrode de referència de Ag/AgCl (model 5044 CRISON). L'extracció de la mostra seca es fa amb la proporció 0,5g/50mL d'extractant (solució ORION); aquesta solució conté àcid sulfàmic (interferència dels nitrits), sulfat d'alumini (per eliminar compostos orgànics) i àcid bòric (com a conservador).	
1	Instrumental i material Elèctrode selectiu de nitrats, elèctrode de referència i potenciòmetre Balança analítica pH -metre 12 Tubs de centrifuga Pipeta de 50 mL Agitador Centrífuga 16 Vasos de precipitats Pipeta aforada 1 mL Pipetes aforades de 1 mL, 2 mL i 5 mL Pipeta graduada de 1mL 4 Matrassos aforats de 50 mL
2	Reactius Solució mare de Nitrat =1400 ppm N-nítric ($10,111 \text{ g KNO}_3$ assecats a l'estufa 1h a 110°C enrasats en 1L amb aigua destil·lada) Solució extractant ($17,32 \text{ g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$, $1,28 \text{ g H}_3\text{BO}_3$ i $2,52 \text{ g NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ ajustant el pH a 3 mitjançant de NaOH Solució reguladora iònica ISA ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2M (66g per 250 mL)
3	Procediment El procediment es pot dividir en 3 etapes: Extracció Pesar 0,5 g de mostra seca molturada en tubs de centrifuga Afegir 50 ml de solució extractant a cada tub Tancar els tubs i agitar-los durant 30 minuts Centrifugar els tubs durant 10 minuts a 3000rpm Abocar el contingut líquid de cada tub en un vas de precipitats Afegir 1 ml de solució reguladora de força iònica (ISA) Calibratge Els patrons es van fer de 14, 28, 70 i 140 ppm de N-nítric Pipetejar 0,5 ml, 1mL, 2,5 mL i 5 mL de solució mare Enrasar en un matràs aforat de 50 mL amb la solució extractant Abocar el contingut del matràs a un vas de precipitat Afegir 1mL de solució ISA Fer les lectures dels patrons a l'elèctrode Fer la recta de calibratge

	Lectura
	Llegir les mostres
4	Càlculs Fer els càlculs de la concentració de nitrats a partir de la recta patró Es calcula el logaritme de les concentracions dels patrons (ppm) S'obté la recta patró a partir de la gràfica. ($Y=aX+b$) logaritme de la concentració de nitrats ($=X$) lectura en mV ($=Y$) $X=(Y-b)/a$ Concentració de nitrats (mg N/L extracte) ($=X^{*10}$) pes de la mostra seca ($=p$) $\text{mg N nítric}/100\text{g sms}=(\text{Concentració de nitrats}\cdot 0,05\cdot 100)/p$
5	Observacions La solució extractant conté àcid sulfàmic, que elimina la interferència dels nitrits, sulfat d'alumini, que elimina la matèria orgànica, i àcid bòric que actua com a conservador A la etapa d'extracció, un cop finalitzada la centrifugació, el contingut líquid del tub de centrifuga s'aboca amb molta cura de que no caigui el residu sòlid al vas de precipitats La solució ISA s'afegeix per minimitzar l'error de les variacions de força dels ions entre els patrons i les mostres Per fer la recta de calibratge es fa una gràfica on la lectura (en mV) es disposa a l'eix Y i el logaritme de la concentració dels patrons (ppm) a l'eix de la X Considerem que la recta és fiable si té un pendent entre -51 i -59 Abans i després de fer les lectures, l'elèctrode es renta amb aigua destil·lada per tal de no contaminar els patrons o les mostres Després de la lectura de les mostres, aquestes es poden guardar a la nevera si es volen conservar per tornar a llegir La solució mare es pot preparar i congelar en pots petits Un cop descongelada, la solució mare, no es pot tornar a congelar La lectura de cada mostra s'ha repetit un mínim de tres vegades. Si dona el mateix valor es canvia de mostra, si no es llegeix fins que dona tres vegades el mateix valor Per a cada mostra, s'hauran de fer 3 repeticions Convé verificar que la pendent i la ordenada en l'origen de les diferents rectes són estables Convé analitzar conjuntament amb cada tanda de mostres una mostra de referència per verificar que el resultat no varia en funció de la calibratge